



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

ABSORCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE METALES EN PLANTAS DE UN AMBIENTE ÁCIDO EXTREMO: EL RÍO TINTO

TESIS DOCTORAL

ALEJANDRO FRANCO HERNÁNDEZ

Directoras:

Dra. Vicenta de la Fuente García

Dra. Lourdes Rufo Nieto

Agradecimientos

Me gustaría agradecer, en primer lugar, a mis dos directoras de tesis, la Dra. Vicenta de la Fuente, y la Dra. Lourdes Rufo, por brindarme los medios y guiarme desde el inicio de mi carrera científica, por su paciencia y sus sabios consejos.

Al Dr. Ricardo Amils, por la confianza depositada en mi, y por su ayuda e interés en el progreso de ésta investigación.

A Nuria Rodríguez, el Dr. Javier Zuluaga, y el Dr. Daniel Sánchez-Mata, por concederme su tiempo, medios y conocimientos siempre que los he necesitado, y por la ayuda prestada en temas relacionados con sus especialidades.

A todo el equipo del Servicio Interdepartamental de Investigación de la UAM, y en especial a Enrique Rodríguez Cañas, gracias por su ayuda y por las largas horas de trabajo compartidas. Al equipo de Microscopía Electrónica de Transmisión del Centro de Biología Molecular Severo-Ochoa y al Centro Nacional de Microscopía Electrónica, gracias por su paciencia y ayuda. Al antiguo Ministerio de Ciencia e Innovación, en particular al programa de becas FPI, en cuyo ámbito ha sido posible la realización de este proyecto.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio durante estos años. Al grupo interdisciplinar de la “hora de comer”, porque hemos conseguido reunir botánica, paleontología, biología celular y zoología en una misma mesa.

A mi padre, mi madre, mi hermana y mi hermano, y amigos que son casi hermanos, que me han dado ánimos y apoyado incondicionalmente, a veces sin saberlo. Sin ellos el camino habría sido demasiado escarpado.

Y de manera especial a mi novia Irene, que ha estado conmigo en todos los buenos y no tan buenos momentos que ha podido dar lugar el desarrollo de esta tesis, por su fuerza, su ayuda, sus consejos, y su especial capacidad para hacerme mantener la cabeza en su sitio.

Es imposible nombrar a todas las personas que, de una manera u otra, han hecho posible esta tesis.

A todos vosotros...

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I. PRESENTACIÓN.....	7
II. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
III. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	15
III.1 El río Tinto.....	15
III.2 Bioclimatología.....	16
III.3 Geología.....	17
III.4 Hidrogeología.....	18
III.5 Edafología.....	20
III.6 Vegetación.....	23
III.7 Metales y Plantas en el río Tinto.....	28
IV. ESPECIES SELECCIONADAS.....	30
IV.1 <i>Nerium oleander</i>	30
IV.2 <i>Cynodon dactylon</i>	32
IV.3 <i>Impertata cylindrica</i>	34
V. OBJETIVOS.....	37

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIAL VEGETAL.....	41
II. TÉCNICAS EMPLEADAS.....	43
II.1 Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).....	43
II.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).....	44
II.3 Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).....	47
II.4 Energía Dispersiva de Rayos X (EDX).....	48

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

I. <i>Nerium oleander</i>	51
II. <i>Cynodon dactylon</i>	62
III. <i>Imperata cylindrica</i>	68

IV. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN.....	73
Absorción y Biomineralización de Fe en <i>Imperata cylindrica</i> (L.) P. Beauv en condiciones controladas.....	73
CONCLUSIONES FINALES.....	91
BIBLIOGRAFÍA.....	95
COPIA DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS	
I. Metal concentration and distribution in plant tissues of <i>Nerium oleander</i> (Apocynaceae, Plantae) from extremely acidic and less extremely acidic water courses in the Río Tinto area (Huelva, Spain).....	125
II. Metal Uptake and Distribution in Cultured Seedlings of <i>Nerium oleander</i> L. (Apocynaceae) from the Río Tinto (Huelva, Spain).....	131
III. Iron absorption, localization, and biomineralization of <i>Cynodon dactylon</i> , a perennial grass from the Río Tinto basin (SW Iberian Peninsula).....	143
IV. Silicon in <i>Imperata cylindrica</i> (L.) P. Beauv: content, distribution, and ultrastructure.....	151
ANEXOS	
I. REFERENCIA COMPLETA DE LAS REVISTAS.....	163
II. OTRAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA TESIS.....	164

INTRODUCCIÓN

I. PRESENTACIÓN

El presente estudio trata sobre las adaptaciones ecológicas que presentan las plantas vasculares en un medio ácido y rico en metales pesados, como es la cuenca del río Tinto (Huelva, España). Se seleccionaron tres especies representativas de la vegetación de ribera del río Tinto y sus afluentes en los tramos alto y medio de su curso, se estudió la concentración y distribución de metales, y las capacidades de acumulación de las plantas sometidas a experimentos de laboratorio bajo condiciones controladas, así como las concentraciones de metales que mantienen en su hábitat natural. También se aborda la concentración, distribución y ultraestructura de silicio en una de las especies seleccionadas, rica en este elemento, el cual presenta un gran interés desde diferentes puntos de vista, como pueden ser la nutrición, mecanismos de defensa y tolerancia frente a metales. Esta tesis, con la autorización de las Directoras de Tesis y el Órgano Responsable del Programa de Doctorado se presenta como un compendio de publicaciones. Las referencias completas de los artículos publicados son:

1. Franco, A., Rufo, L., Fuente, V., (2012). Metal concentration and distribution in plant tissues of *Nerium oleander* (Apocynaceae, Plantae) from extremely acidic and less extremely acidic water courses in the Río Tinto area (Huelva, Spain). Ecol. Eng. 47: 87-91.
2. Franco, A., Rufo, L., Zuluaga, J., Fuente, V., (2013). Metal Uptake and Distribution in Cultured Seedlings of *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) from the Río Tinto (Huelva, Spain). Biol. Trace. Elem. Res. 155: 82-92.
3. Franco, A., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Fuente, V., (2013). Iron absorption, localization, and biomineralization of *Cynodon dactylon*, a perennial grass from the Río Tinto basin (SW Iberian Peninsula). J. Plant Nutr. Soil Sci. 176: 836-842.
4. Rufo, L., Franco, A., Fuente, V., (2013). Silicon in *Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv: content, distribution, and ultrastructure. Protoplasma 251 (4): 921-930.

INTRODUCCIÓN

Los artículos presentados amplían los conocimientos que nos permiten comprender las interacciones entre estas tres especies de plantas y los metales presentes en su sustrato, de manera que pudieran ser aplicadas en programas de restauración, ya sea en la cuenca del río Tinto, como en entornos mineros de características similares.

II – INTRODUCCIÓN GENERAL

La absorción de metales es un proceso fundamental en el metabolismo de las plantas. Algunos elementos que se consideran metales pesados son micronutrientes indispensables que presentan funciones específicas, asociados a enzimas que intervienen en distintos procesos metabólicos como la respiración (Cu, Fe, Mn, Zn), la síntesis de clorofila (Cu, Fe, Zn) y la fotosíntesis (Cu, Mn). Fe, Mn, Cu y Mo forman parte de grupos prostéticos que catalizan reacciones de oxidación-reducción, además de intervenir en la síntesis de proteínas; Fe y Zn forman complejos enzima-sustrato; Cu, Mn y Zn son cofactores de enzimas. El Mn también interviene en la permeabilidad de la membrana celular y el Mo es un componente de la nitrato reductasa. Estas metalobiomoléculas son, por norma general, insustituibles, muy eficientes y selectivas. No obstante, el exceso de un determinado metal por encima del nivel crítico de acumulación puede afectar la salud de la planta llevándola incluso a su muerte (De Vos et al., 1989; Krupa et al., 1993; Sheldon y Menzies, 2005). Por ello, las plantas suelen mostrar una capacidad variable a la hora de absorber estos elementos, que en algunos casos llevan a mecanismos de tolerancia específicos, como la acumulación de altas dosis de metal en formas no fitotóxicas, o el desarrollo de barreras mecánicas y/o fisiológicas para reducir su absorción.

En las plantas, el mayor aporte de estos elementos proviene del sustrato sobre el que se asientan. Los metales se encuentran en el suelo en diferentes formas: (1) metales disueltos e intercambiables (2) en compuestos insolubles o precipitados, por ejemplo óxidos, carbonatos e hidróxidos, etc.; (3) unidos a compuestos orgánicos; y (4) como elementos trazas residuales (Salt et al., 1995). La disponibilidad biológica de estos elementos en los suelos depende de numerosos factores, entre los que destacan el pH, el contenido de materia orgánica y el estado de oxidación. Particularmente el pH tiene un factor determinante, pues en suelos con pH inferior a 6, la solubilidad del Fe, Cu, Mn y Zn aumenta. Por ello, los ambientes ácidos y oxidantes generalmente presentan una mayor liberación de estos metales a través de los fenómenos de meteorización.

Los suelos metalíferos son aquellos que presentan, de forma natural o por causas antrópicas, elevadas concentraciones de metales pesados biodisponibles. En ellos crecen floras específicas compuestas por especies de plantas metalófitas que han desarrollado mecanismos que les permiten resistir concentraciones de metales tóxicas para la

mayoría de las plantas (Baker, 1987; Reeves y Baker, 2000; Boularbah et al., 2000; Dickinson et al., 2009). El conjunto de plantas metalófitas está integrado por todas las plantas tolerantes, bien sean endémicas (metalófitos estrictos) o ecotipos desarrollados a partir de especies de distribución más amplia (metalófitos facultativos). Aún se desconocen gran parte de los mecanismos metabólicos que están relacionados con la tolerancia a los metales pesados, no obstante en función de las respuestas que presentan a las altas concentraciones de metales, las especies que conforman estas floras se han clasificado, según los estudios de Baker (1981), Baker y Walker (1990) y Reeves y Baker (2000), en:

(I) exclusoras: si mantienen constante la concentración de metal en sus partes aéreas, por debajo de los valores encontrados en el suelo, bien evitando su absorción o formando complejos metálicos estables en las células de la raíz para evitar la translocación del metal;

(II) indicadoras: si la absorción y el transporte de los metales en las partes aéreas está regulado de forma que refleja la concentración de metales en el suelo, al menos hasta una concentración límite donde comienza la toxicidad;

(III) acumuladoras: si absorben el metal y lo acumulan en sus partes aéreas independientemente de la concentración en el suelo, mediante mecanismos como la unión de los metales a las paredes celulares, compartimentándolos en vacuolas o acomplejándolos con ciertos ácidos orgánicos o proteínas (Baker, 1981; Reeves y Baker, 2000). Dentro las plantas acumuladoras, se consideran plantas hiperacumuladoras aquellas que acumulan metales en una concentración 100 veces superior a los valores normales esperados en plantas no acumuladoras (Brooks et al., 1977; Reeves y Baker, 2000).

Estas especies y ecotipos adaptados a entornos metalíferos resultan muy útiles en programas de recuperación de terrenos contaminados con metales pesados (Smith y Bradshaw, 1979; Rufo y Fuente, 2010b). En general, las técnicas de remediación de suelos, ya sean *in situ* o *ex situ*, tienen dos objetivos: la limpieza del terreno mediante la retirada o extracción de los contaminantes del sustrato; o la reducción de los riesgos que suponen los contaminantes limitando la exposición mediante la estabilización del terreno (Vangronsveld et al., 2009).

Hasta ahora, se conocen pocos territorios donde se practique la extracción de metales y metaloides de suelos y sedimentos a gran escala mediante el uso de plantas. La mayoría de los ensayos realizados hasta el momento se han centrado en la identificación y el uso a pequeña escala de especies hiperacumuladoras, como *Thlaspi caerulescens* en el caso de Pb, Zn, Cd, Ni, *Alyssum* spp. para Ni y Co, *Berkheya coddii* y *Phyllanthus* spp. para Ni y *Pteris vittata* para As (Baker et al., 1994; Robinson et al., 1997; Brooks et al., 2001; Ma et al., 2001; Francesconi et al., 2002; Zhao et al., 2002; Keeling et al., 2003; Li et al., 2003; Schwartz et al., 2003; Caille et al., 2004; Fayiga et al., 2004; Huang et al., 2004; Tu et al., 2004; McGrath et al., 2006; Wang et al., 2006; Bani et al., 2007; Berazaín et al., 2007a; Fuente et al., 2007a). Sin embargo, la mayor parte de las plantas hiperacumuladoras son especies de poca biomasa, crecimiento lento y sistema radicular poco profundo (Ernst, 1996; Keller et al., 2003; Laidlaw et al., 2012), además de presentar, por lo general, una capacidad de acumulación específica para un determinado elemento, limitando el alcance de su aplicación en entornos con condiciones reales de contaminación (Dickinson et al., 2009). Los conocimientos actuales sobre el aislamiento genético y la caracterización de genes que expresen los rasgos de hiperacumulación, tampoco han permitido transferir estos caracteres a otras especies para obtener una mayor producción de manera eficiente, además de plantear otros riesgos y problemas ambientales asociados. En cualquier caso la extracción de metales usando plantas (fitoextracción) es una tecnología importante en la limpieza de tierras contaminadas y por ello surgen planteamientos alternativos, como el empleo de plantas de crecimiento rápido, como *Alnus*, *Salix* y *Populus* spp. (Ostman, 1994; Landberg y Greger, 1996; McLeod y Ciravolo, 1998; Bañuelos et al., 1999; Dickinson, 2000; Robinson et al., 2000; Keller et al., 2003; Klang-Westin y Eriksson, 2003; Pulford y Watson, 2003; Rosselli et al., 2003; Vandecasteele et al., 2004; French et al., 2006; King et al., 2006), que acumulan concentraciones por debajo de los valores de plantas hiperacumuladoras, pero cuya producción de biomasa y capacidad de acumular varios metales puede hacerlas igual, si no más eficaces en la fitoextracción de metales (Liu et al., 2005; Mok et al., 2013).

Por otro lado, la dificultad de obtener una extracción eficiente ha promovido un aumento de interés en técnicas que permitan la inmovilización del metal en el suelo y/o eviten su paso a la cadena trófica (fitoexclusión/fitoestabilización). El uso de plantas

exclusoras, que retienen los metales en la superficie o el cortex de la raíz impidiendo su transporte en altas concentraciones a las partes que pueden entrar en la cadena trófica con mayor facilidad como hojas, frutos y semillas, es una alternativa a tener en cuenta en la selección de cultivos. Un correcto establecimiento y colonización de una cobertura vegetal compuesta de especies tolerantes reduce la erosión superficial y favorece la recuperación de la estructura del suelo, controla la dispersión de los metales por lixiviación o transporte aéreo reduciendo el riesgo de una mayor degradación del entorno, además de mejorar el impacto visual del paisaje (Loidi, 1994; Bradshaw, 1997; Bargagli, 1998; Wong, 2003; Dickinson et al., 2005).

El empleo de especies vegetales para eliminar, degradar o inmovilizar contaminantes en suelos, sedimentos y aguas es conocido como fitorremediación (Fuente y Rufo, 2005). Según el método de aplicación y posibles resultados, encontramos diferentes técnicas de fitorremediación:

Fitoextracción: Retirada de los metales del suelo mediante plantas que los absorben a través de sus raíces y los translocan a sus partes aéreas, que son posteriormente cosechadas. En algunos casos puede recuperarse el metal extraído del medio (fitominería). Las plantas usadas deben acumular más de 1000 mg/kg de peso seco, con coeficientes de bioacumulación y translocación superiores a 1 (Dowdy y McKone, 1997; Reeves y Baker, 2000; Min et al., 2007).

Fitovolatilización: El uso de plantas que, una vez absorbido el contaminante, lo volatilizan y lo liberan a la atmósfera.

Fitofiltración: Se usa en aguas o medios acuosos contaminados para absorber o adsorber el contaminante en las raíces (rizofiltración) o en plántulas (blastofiltración) (Prasad y Freitas, 2003).

Fitoestabilización: Se basa en la interacción de las raíces y la rizosfera de las plantas para inmovilizar el metal en el suelo, absorbiendo, adsorbiendo, acomplejando o simplemente precipitando el contaminante.

De cada técnica depende la elección del tipo de planta más adecuado para obtener los mejores resultados. Las plantas indicadoras permiten conocer los metales que hay en los suelos sobre los que crecen, por lo que son útiles para localizar y monitorizar terrenos

ricos en metales, las plantas hiperacumuladoras son idóneas para la fitoextracción por la translocación del contaminante a las partes aéreas que son más fáciles de cosechar, así como las plantas exclusoras pueden ser más apropiadas para fitoestabilizar un territorio precisamente manteniendo el contaminante en el suelo.

Los suelos de zonas industriales en uso y abandonadas, y de zonas urbanas, ofrecen una oportunidad a gran escala para usar la fitorremediación como tecnología. Para ello se ha de tener en cuenta un profundo conocimiento de los territorios en términos geomorfológicos, edáficos y de vegetación previos. Estos conocimientos son la base para la selección de las especies más adecuadas para el medio que se pretende remediar.

En estos casos, la selección de especies nativas supone una ventaja, ya que están previamente adaptadas a las condiciones ambientales que pueden alterar la eficiencia de la fitorremediación (Danh et al., 2009), como los regímenes de temperatura y humedad, variaciones estacionales y otros factores asociados al suelo como el pH, la escasa concentración de nutrientes y la misma presencia de los metales. Además, promoviendo el potencial de la vegetación natural del territorio, se favorece la conservación tanto de especies endémicas como de las comunidades vegetales de la región y la biodiversidad asociada.



Figura 1: Fotografías de distintos entornos de la cuenca del río Tinto. **A, B y C:** El río Tinto y detalles de sus aguas rojas. **D y E:** Instalaciones mineras en el curso alto. **F:** Confluencia de un arroyo de aguas claras con uno de aguas rojas a la altura de La Naya. **G y H:** Afluentes de aguas claras.

III – DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

III.1 – El río Tinto

La cuenca del río Tinto, al sur de la Península Ibérica, es un claro ejemplo de ambiente metalífero extremo natural, siendo además un entorno minero de gran importancia histórica (Figura 1). Los grandes depósitos de sulfuros metálicos sobre los que se asienta han sido explotados desde la antigüedad extrayéndose cobre, oro y plata de sus diferentes minas. Esta explotación tanto a cielo abierto como en profundidad, así como la actividad de las poblaciones asociadas, de carácter itinerante dependiendo del área de explotación activa en cada momento, han producido una alteración de los suelos, la pérdida de cobertura vegetal, y un aumento en las condiciones de acidez y concentración de metales en todo el territorio.

El nacimiento del río Tinto se sitúa en la Peña de Hierro, en las proximidades de Pico del Padre Caro al sur de la Sierra de la Aracena (Huelva, España). La cuenca del río cubre un área de 1730 km² y limita al este con la cuenca del río Guadalquivir (en la provincia de Sevilla) y al oeste con la cuenca del río Odiel. Su longitud es de 92 km hasta su desembocadura en el océano Atlántico en el Estuario de Huelva, junto al río Odiel. En su curso alto, que comprende los municipios de Berrocal hasta Niebla, discurre entre taludes de pizarras, sobre un lecho pedregoso; continúa formando grandes meandros encajado sobre las terrazas arenosas en su curso medio desde La Palma del Condado hasta Palos de la Frontera; y por último en su curso bajo, que comienza en San Juan del Puerto, hasta su desembocadura en el Atlántico, el cauce y la llanura de inundación del río se componen principalmente de gravas, arenas, limos y arcillas del Cuaternario.

III.2 – Bioclimatología

Rivas-Martínez (2007) define la cuenca del río Tinto dentro del Macrobioclima Mediterráneo, bioclima Mediterráneo Pluviestacional Oceánico. El termotipo dominante que encontramos en el territorio es el Termomediterráneo, con algunas localidades puntuales del Mesomediterráneo en relación a la topografía y por encima de los 480m de altitud. El ombrotipo varía, siendo seco en las zonas más próximas a su desembocadura y de sub-húmedo a húmedo en las localidades próximas al nacimiento del río. Las temperaturas medias varían entre los 19,2 °C y 16,4 °C con una ausencia general de heladas. Las mayores precipitaciones se recogen en invierno, con periodos de sequía en los meses estivales, en los que las precipitaciones son inferiores al doble de la temperatura ($P < 2T$) en al menos dos meses consecutivos.

La cuenca del río Tinto está sustentada principalmente por materiales de baja permeabilidad y consecuentemente la descarga del río es altamente dependiente del régimen de lluvias. Esto crea una marcada variación anual en su caudal, con grandes periodos de sequía que contrastan con la inundación del terreno cerca del río y con las fuertes corrientes resultantes que causan erosión y transporte de grandes cantidades de materiales edáficos y sedimentos durante las estaciones húmedas. El caudal medio es de 20 hm³ /año, llegando a valores mínimos de 3,15 hm³/año (Amils et al., 2003).

III.3 – Geología

La principal característica geológica de la cuenca del río Tinto, que marcará las bases químicas de todo el ecosistema, se encuentra en su curso alto. El nacimiento del río se sitúa en medio del complejo volcánico sedimentario denominado Faja Pirítica Ibérica (FPI). Este complejo constituye una franja de 250 Km de longitud y entre 25-70 Km de ancho de depósitos de sulfuros metálicos, con presencia dominante de menas de pirita, además de calcopirita, blenda, galena y otros minerales (Almodóvar et al., 1998).

La Faja Pirítica presenta un registro geológico relativamente simple (Schermerhorn, 1971), el cual incluye de 1000 a 5000 metros de rocas del Paleozoico superior. La secuencia más antigua es el Grupo PQ (Filítico-Cuarcítico) (Devónico Superior, 375 M.a.). De potencia superior a los 2000 m, se compone de detritos, lodos y arenas típicas de una plataforma continental (Tornos, 2006). Por encima del Grupo PQ, se encuentra el Complejo Volcánico Sedimentario (VSC), (Devónico Superior-Carbonífero Inferior, 369-333 M.a.). El VSC acoge los depósitos masivos de sulfuros y de manganeso (Sáez et al., 1996). Consiste en un grupo heterogéneo de rocas con rápidos cambios de facies laterales y verticales. En el caso concreto del distrito del río Tinto, la secuencia del VSC incluye grupos de sulfuros masivos, intrusivos tanto en pizarras, como en rocas volcánicas coherentes. La secuencia más superficial son las rocas del Grupo Culm (Carbonífero, 350-300 M.a.), compuesto principalmente por pizarras, litoarenitas y conglomerados con caracteres turbídicos (Tornos, 2006).

Más allá de su curso alto, el río queda encajado primero en las terrazas arenosas del cuaternario (Pleistoceno 1,8 m.a.), y más adelante se sigue desplazando a través de las arenas y areniscas del Neógeno (serie Mioceno, Saheliense 6.5-5.3 m.a.) (IGME, 1970).

III.4 – Hidrogeología

Las aguas del río Tinto presentan una extrema acidez, con un pH medio de 2,3, y sus componentes principales son los iones SO_4^{2-} y Fe^{3+} , con concentraciones superiores a 10.000 mg/L y 2.000 mg/L respectivamente (López-Archilla et al., 2001). Las características físico-químicas de las aguas vienen condicionadas por la litología de los materiales que atraviesan, así como por la influencia de las actividades que tienen lugar en su cuenca de drenaje. En la cuenca del río Tinto, los abundantes depósitos de sulfuros de la FPI expuestos a condiciones atmosféricas sufren un proceso de degradación oxidativa generando acidez y liberando sulfato, Fe^{2+} y los metales y metaloides abundantes en este tipo de depósitos (As, Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn, etc) (Cánovas et al., 2007).

La presencia de oxígeno, y principalmente, la acción de los microorganismos *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans* y *Ferroplasma* sp. (Amils et al., 2003; 2004) cierran el ciclo del Fe produciendo la oxidación del ión ferroso a ión férrico. Es este Fe^{3+} el que, debido a su fuerte capacidad tampón, mantiene constantes los valores de acidez del río, oxidando más pirita o precipitándose en forma de hidróxidos de Fe. (Cánovas et al., 2007). Las elevadas concentraciones de este ión Fe^{3+} son las que proporcionan a las aguas el color rojo, característico de las mismas y que dan nombre al río.

Estas características de por sí extremas, se ven acentuadas por la intensa actividad minera en el primer tramo del río. Las aguas del río reciben descargas de drenajes ácidos de las minas, como los lixiviados procedentes de la antigua mina de Peña de Hierro, los vertidos procedentes de los túneles de drenaje de los trabajos subterráneos en el distrito minero de Ríotinto, y los drenajes provenientes de la mina Zarandas-Naya (Cánovas et al., 2008). Las concentraciones medias y máximas de metales pesados disueltos son claramente mayores cerca de estas fuentes, lo que crea una mayor variabilidad en las concentraciones individuales de estos elementos durante su paso por la región minera (De la Torre et al., 2011).

Dado que se trata de un río mediterráneo, la composición de las aguas del río Tinto también presenta un componente estacional, que conlleva un proceso cíclico de precipitación de los metales en formas minerales durante las sequías estivales seguida

de una redisolución de éstos minerales en los periodos de lluvias (Hudson-Edwards et al., 1999; Buckby et al., 2003; Galán et al., 2003; Cánovas et al., 2007; 2008), si bien no se produce una alteración excesiva de las características fisicoquímicas del entorno (Lopez-Archilla et al., 2001).

El río mantiene estas características fisicoquímicas prácticamente en toda su extensión hasta el inicio del Estuario de Huelva en su último tramo, pese a irse incorporando a su cauce muchos de sus afluentes de aguas claras. Una vez que las aguas alcanzan la localidad de San Juan del Puerto, comienza la mezcla con las aguas marinas, disminuyendo la carga de metales y produciéndose un incremento de pH y salinidad, que aumenta a medida que se acerca a Huelva.

III.5 – Edafología

La geoquímica superficial de los suelos de las zonas asociadas al río Tinto (tabla 1) ha sido estudiada en detalle en toda la longitud del río por Rufo et al. (2007). Otros trabajos han estudiado la composición y formación de los suelos de manera local o asociados a las diferentes comunidades vegetales de la región (Bellinfante et al., 1980; Heredia et al., 1980a y b; Soldevilla et al., 1992; Rodríguez et al., 2007; Rufo et al., 2010).

Los suelos del tramo alto de la cuenca del río Tinto presentan un pH extremadamente bajo, una alta disponibilidad de metales pesados y son pobres en nutrientes. La extrema acidez provoca la disolución de los minerales y el lavado del suelo, con la consecuente pérdida tanto de nutrientes como de metales pesados (Straughan et al., 1981). El origen de esta acidez es la alta concentración de pirita, que al degradarse o ser oxidada por los microorganismos, genera grandes cantidades de hierro ferroso y sulfuro (López-Archilla et al., 2001). Este proceso se ve acentuado por los depósitos generados por la fundición de pirita durante la actividad minera.

El hierro es uno de los elementos más abundantes en estos suelos, sobre todo en los horizontes inferiores. Otros elementos con altas concentraciones son S, Pb, Cu, Zn y As. Algunos nutrientes, como Na, Mg, K, Ca y P, aparecen en concentraciones muy bajas. En las zonas con cubierta vegetal, los suelos están más desarrollados, y el horizonte superficial tiene un alto contenido en materia orgánica, debido a la presencia de plantas que son difíciles de degradar debido a la hidromorfía del suelo, lo que hace difícil su mineralización y humificación.

Los minerales con mayor presencia son cuarzo, filosilicatos (illita, caolinita), óxidos de hierro (goetita, hematita, magnetita), y feldespatos de Na, K y Ca. La presencia de sulfatos de hierro insolubles (jarosita), los cuales precipitan con la desecación de los suelos en el periodo estival, es un signo de hidromorfía. Además aparece yeso, calcantita, y azufre.

Tabla 1: Composición mineralógica y medias con desviaciones típicas de pH, conductividad eléctrica y composición elemental (mg/kg) de los suelos de la cuenca del río Tinto. Q (Cuarzo), J (Jarosita), Gy (Yeso), Ps (Filosilicatos), FK (Feldespato potásico), FCa-Na (Feldespato cálcico-sódico), Fe-Ox (Óxidos de hierro).

Elementos	Suelos			
	Nacimiento	Curso medio	Estuario	Bosques y Matorrales
pH	3,13±0,43	2,58±1,08	6,27±1,72	3,92±0,824
E.C.	2,05±1,78	1,80±1,22	5,70±2,97	3,64±0,666
S	18.057±9210	28.657±26,021	9713±6465	3210±4130
K	4790±4254	7301±8149	3978±1390	1288±834,3
Ca	14.061±31.368	3876±5037	8398±7058	674,9±1107
Mn	275±294	244±239	327±363	283,8±420,4
Fe	100.032±34.285	122.549±41.044	73.142±35.582	73.100±70.800
Co	139±86	188±109	216±138	8,16±7,46
Ni	32,4±27,7	43,8±17,5	53,6±18,0	15,09±11,84
Cu	299±272	567±432	1261±515	226,4±189,5
Zn	132±47	372±296	1431±974	126,2±71,45
As	610±817	1446±888	758±555	841,6±1339
Pb	918±1266	1962±1483	709±550	889,2±1101
Cr	104±74	129±156	138±157	12,53±11,45
Na	1238±1124	2853±3166	17.989±133.289	143,5±98,49
Mg	2524±1974	3696±2058	10.058±5878	1513±1175
Al	9325±5694	20.978±15.952	27.389±16.274	8280±5020
Ti	182±153	948±1074	227±146	78,67±98,94
P	239±155	224±150	3625±3298	133,6±89,75
Comp. Min.	Q, J, Fe-Ox, Ps, FCa-Na, FK, Gy	Q, Ps, FK, J, FCa-Na	Q, Ps, FK, FCa-Na	Q, Ps, FCa-Na

Los suelos del tramo medio también presentan una extrema acidez. Por norma general se encuentran peor desarrollados que los del tramo anterior, ya que las inundaciones recurrentes arrastran la materia orgánica y los sedimentos anualmente, sustituyéndolos por nuevos sedimentos, renovando los suelos. Los materiales que llegan arrastrados por el agua llevan grandes cantidades de S y metales (Hudson-Edwards et al., 1999; Braungardt et al., 2003; Galán et al., 2003). La dinámica de erosión y transporte genera altas concentraciones de S, Fe, As, Pb, Cu y Zn en los horizontes superiores de estos suelos, similares a los horizontes inferiores de la primera sección, aunque las concentraciones de Fe, As y Pb son las más altas de todo el río. Se mantienen las bajas concentraciones de Na, Mg, K, Ca y P.

INTRODUCCIÓN

El cuarzo, los filosilicatos (illita) y los feldespatos son los minerales dominantes. Aparecen otros minerales como caolinita, esmectita, K-jarosita, yeso y dolomita, además de óxidos de hierro cristalizados.

El pH de los suelos del último tramo del río varía de extremadamente ácido a ligeramente alcalino debido a la influencia del agua del mar. Destaca en su composición una mayor concentración de Na, Mg y P respecto al resto de los suelos del río. Presentan también grandes cantidades de S y Fe, y son los suelos con mayor concentración de Cu y Zn debida a la mayor movilidad de estos elementos (Hudson-Edwards et al., 1999; Braungardt et al., 2003; Galán et al., 2003). Los minerales predominantes son el cuarzo y los filosilicatos (caolinita e illita).

Los suelos de las zonas más alejadas de las aguas del río, cubiertos por la vegetación climatófila, son principalmente entisoles e inceptisoles con afloramientos rocosos, desarrollados sobre materiales silíceos. Su pH es ácido, aunque mayor que los de los dos primeros tramos cercanos al río. Los horizontes superficiales acumulan cantidades de C orgánico elevadas que disminuyen rápidamente al bajar por el perfil. Tienen altas concentraciones de S, Fe, As, Pb, Cu y Zn, si bien inferiores a los suelos en contacto con el río, y como éstos, tienen bajas concentraciones de nutrientes Na, Mg, Ca, P y K.

III.6 – Vegetación

Desde un punto de vista botánico, el territorio constituye un área límite para muchas especies y comunidades vegetales. Para una correcta interpretación de la vegetación actual es necesario acudir a datos de estudios particulares de la zona y también de estudios en regiones cercanas. Se considera de especial interés el estudio de Rivas-Goday (1964) “*Vegetación y flórula de la cuenca extremeña del Guadiana*”, así como otras obras de flora y vegetación realizadas en el marco luso-extremadureño y áreas limítrofes (Ladero, 1970; 1974; 1977; 1987; Pérez-Chiscano, 1975; 1976; 1983; 1994; Rivas-Martínez et al., 1980; Cabezudo y Rivera, 1980; Rivera, 1980; Rivera y Cabezudo, 1981, 1985; Belmonte, 1986; Lousã, 1986; Ruiz, 1986; Asensi y Díez-Garretas, 1987; Santos, 1987; Valdés et al., 1987; Ladero et al., 1988; Rivas-Martínez, 1988; Cabezudo et al., 1989; Rivas-Martínez et al., 1990; Ladero et al., 1990; Amor et al., 1993; Cano et al., 1993; Pérez-Latorre, 1993; Devesa, 1995; Pérez-Latorre et al., 1993, 1994a, 1994b, 1997, 2002; Costa et al., 1996; Galán de Mera et al., 1997; García et al., 1998; Ladero y Amor, 1999; Lousã et al., 1999; Cabezudo y Pérez-Latorre, 1999; Valle et al., 2003, 2004; Valdés et al., 2008).

Con estos antecedentes, en los últimos años un completo estudio de las fitocenosis de la cuenca del río Tinto desde los puntos de vista florístico, fitosociológico y sinfitosociológico ha sido realizado y plasmado en trabajos científicos por los siguientes autores: Fuente et al. (2007b); Rodríguez et al. (2007); Fuente et al., (2008); Rufo y Fuente (2008); Rufo et al. (2009); Rufo y Fuente (2009); Rufo y Fuente (2010a y b); Rufo y Fuente (2011).

Los cursos de aguas de la cuenca del Tinto se distinguen por su grado de acidez y concentración de metales, presentando los más ácidos (cursos de agua extremadamente ácidos: EA, pH <3) y ricos en metales una coloración rojiza debido a su elevada concentración de hierro férrico, mientras que los cursos de aguas menos ácidos (LEA, pH >3) suelen presentar menor concentración de metales y una coloración clara. La vegetación de ribera de los cursos alto y medio del río Tinto (Figura 2), tanto en cauces permanentes como estacionales, está representada por la geoserie de vegetación edafohigrófila *Scrophulario scorodoniae-Alno glutinosae*, que incluye las series *Nerio oleandri-Salici pedicellatae* S. correspondiente a saucedas, las más cercanas a los cauces en las orillas o promontorios que surgen del mismo lecho; *Scrophulario*

scorodoniae-Alno glutinosae S. o alisedas en los bordes del cauces con aguas permanentes; *Oenanthe crocatae-Nerio oleandri* S., adelfares que se sitúan en las bandas donde sufren la sequía en los meses de verano; y *Ficario ranunculoidis-Fraxino angustifoliae* S., fresnedas en las bandas más secas de los cauces de agua permanente, donde son rara vez inundadas. Dadas las características del terreno en estos dos sectores del río, existe una dominancia de los adelfares, que aparecen como etapa serial tras la degradación de la aliseda o como comunidad permanente en los territorios donde la edafogénesis del terreno no permite la formación de la aliseda.



Figura 2: Representación de la geoserie de vegetación edafohigrófila *Scrophulario scorodoniae-Alno glutinosae* en la cuenca del río Tinto. **A:** *Nerio oleandri-Salici pedicellatae* S. **B:** *Scrophulario scorodoniae-Alno glutinosae* S. **C:** *Ficario ranunculoidis-Fraxino angustifoliae* S. **D:** *Oenanthe crocatae-Nerio oleandri* S. **E:** *Oenanthe crocatae-Nerietum oleandri ericetosum andevalensis*.

Tabla 2: Citas de especies recogidas en la bibliografía que habitan los diferentes tipos de cursos de agua en el río Tinto.

Plantas de Aguas Extrem. Ácidas	Plantas en Ambos Tipos de Aguas	Plantas de Aguas Menos Ácidas
<i>Bolboschoenus maritimus</i> subsp. <i>compactus</i> (Hoffm.) Hejny.	<i>Agrostis stolonifera</i> L.	<i>Alisma plantago-aquatica</i> L.
<i>Erica andevalensis</i> Cabezudo y J. Rivera	<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn.	<i>Apium nodiflorum</i> L. (Lag.)
<i>Erica scoparia</i> L.	<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	<i>Arisarum simorrhinum</i> Durieu in Duch.
<i>Juncus articulatus</i> L.	<i>Daucus carota</i> L.	<i>Arum italicum</i> Mill.
<i>Juncus subulatus</i> Forssk.	<i>Equisetum ramosissimum</i> Desf.	<i>Bryonia dioica</i> Jacq.
<i>Lathyrus clymenum</i> L.	<i>Erica arborea</i> L.	<i>Carex paniculata</i> subsp. <i>lusitanica</i> (Schkuhr ex Willd.) Maire
<i>Lathyrus latifolius</i> L.	<i>Erica australis</i> L.	<i>Carex reuteriana</i> subsp. <i>Tartessiana</i> (Luceño & Aedo) Rivas Mart.
<i>Molinia caerulea</i> subsp. <i>arundinacea</i> (Schränk) H. Paul	<i>Erica lusitanica</i> Rudolphi	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.
<i>Poa trivialis</i> L.	<i>Flueggea tinctoria</i> (L.) G.L. Webster.	<i>Cyperus longus</i> subsp. <i>badius</i> (Desf.) Murb. Bonnier & Layens
<i>Rumex crispus</i> L.	<i>Holcus lanatus</i> L.	<i>Festuca ampla</i> Hackel
<i>Tamarix africana</i> Poir.	<i>Hypericum perforatum</i> L.	<i>Festuca arundinacea</i> subsp. <i>mediterranea</i> (Hack.) K. Richt.
<i>Tamarix gallica</i> L.	<i>Imperata cylindrica</i> (L.) Raeusch.	<i>Fraxinus angustifolia</i> Vahl.
<i>Trifolium dubium</i> Sibth.	<i>Jacobaea vulgaris</i> Gaertn.	<i>Galium tricornutum</i> Dandy
	<i>Juncus acutus</i> L.	<i>Hedera helix</i> L.
	<i>Juncus effusus</i> var. <i>subglomeratus</i> DC.	<i>Hyoscyamus albus</i> L.
	<i>Juncus maritimus</i> Lam.	<i>Juncus inflexus</i> L.
	<i>Juncus rugosus</i> Steud.	<i>Juncus subnodulosus</i> Schrank
	<i>Lonicera periclymenum</i> subsp. <i>hispanica</i> (Boiss. & Reut.).	<i>Lapsana communis</i> L.
	<i>Mentha suaveolens</i> Ehrh.	<i>Linum angustifolium</i> Huds.
	<i>Nerium oleander</i> L.	<i>Lolium perenne</i> L.
	<i>Panicum repens</i> L.	<i>Lotus pedunculatus</i> Cav.
	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	<i>Lythrum salicaria</i> L.
	<i>Polypogon monspeliensis</i> (L.) Desf	<i>Oenanthe crocata</i> L.
	<i>Populus nigra</i> L.	<i>Plantago lanceolata</i> L.
	<i>Pteridium aquilinum</i> (L.) Kuhn	<i>Plantago major</i> L.
	<i>Rosa canina</i> L.	<i>Poa nemoralis</i> L.
	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	<i>Polypogon maritimus</i> Willd.
	<i>Rumex conglomeratus</i> Murray	<i>Populus alba</i> L.
	<i>Salix pedicellata</i> Desf.	<i>Ranunculus ficaria</i> L.
	<i>Saponaria officinalis</i> L.	<i>Ranunculus repens</i> L.
	<i>Scirpoides holoschoenus</i> (L.) Soják	<i>Ranunculus trilobus</i> Desf.
	<i>Scrophularia scorodonia</i> L.	<i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> (L.) Hayek
	<i>Smilax aspera</i> L.	<i>Salix alba</i> L.
	<i>Tamus communis</i> L.	<i>Salix fragilis</i> L.
	<i>Trifolium pratense</i> L.	<i>Schoenoplectus lacustris</i> L. (Palla)
	<i>Typha domingensis</i> (Pers.) Steud.	<i>Solanum dulcamara</i> L.
	<i>Vitis vinifera</i> subsp. <i>sylvestris</i> (C.C. Gmel.) Hegi	<i>Stachys arvensis</i> (L.) L.
		<i>Stellaria media</i> (L.) Vill.
		<i>Trifolium angustifolium</i> L.
		<i>Trifolium campestre</i> Scherb.
		<i>Trifolium ochroleucon</i> Huds.
		<i>Trifolium repens</i> L.
		<i>Trisetum flavescens</i> (L.) P. Beauv.
		<i>Ulmus minor</i> Mill.
		<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.
		<i>Vinca difformis</i> Pourr.
		<i>Viola riviniana</i> Rchb.

En los cursos de agua más ácidos y con mayor carga de metal, la diversidad vegetal se reduce. Los cursos de aguas extremadamente ácidas carecen de plantas totalmente sumergidas, pero presentan comunidades vegetales en sus márgenes compuestas de pequeños matorrales dominados por *Nerium oleander*, brezales y pastizales húmedos en los suelos inundados estacionalmente, con especies como *Scirpoides holoschoenus*, *Erica australis*, *Imperata cylindrica*, *Phragmites australis* y *Typha domingensis* entre otras, junto con los endemismos *Erica andevalensis* y *Juncus rugosus*. Esta vegetación se identifica con una faciación acidófila de los adelfares, *Oenanthe crocatae-Nerietum oleandri ericetosum andevalensis*.

Del análisis de la distribución de las plantas presentes en las diferentes riberas de la cuenca del Tinto en función de la acidez, los metales y otros parámetros de las aguas se deduce que la distribución está muy relacionada con el pH, el potencial redox y las concentraciones de Fe y de O₂ en las aguas. Las especies más frecuentes en las aguas extremadamente ácidas (pH < 3) son *N. oleander*, *E. andevalensis*, *Scirpoides holoschoenus*, *P. australis*, *J. rugosus* y *Agrostis stolonifera*, mientras que en los cursos de agua menos ácida (pH > 3) predominan *N. oleander*, *Rubus ulmifolius*, *S. holoschoenus*, *Cyperus longus* subsp. *badius*, *Oenanthe crocata* y *Arum italicum* (Rufo et al., 2011). Algunas de estas especies aparecen exclusivamente en uno de estos tipos de aguas, mientras otras aparecen en ambos indistintamente (tabla 2).

La vegetación potencial climatófila del territorio corresponde a bosques esclerófilos (encinares y alcornocales) de la clase *Quercetea Ilicis*. La serie de vegetación correspondiente a los encinares termófilos (serie climatófila mediterránea iberoatlántica silicícola termomediterránea seco-subhúmeda inferior de los bosques de *Quercus rotundifolia* con *Myrtus communis*: *Myrto communis-Quercus rotundifoliae* S.) es la que ocupa mayor extensión en la cuenca del río. Además presenta diferentes facies en función del grado de humedad (faciación típica de *Myrtus communis*, faciación húmeda de *Quercus broteroi*). Se trata de bosques de *Quercus rotundifolia* con presencia de numerosas especies termófilas como *Olea europaea* subsp. *sylvestris*, *Myrtus communis*, *Pistacia lentiscus*, *Quercus coccifera*, *Rhamnus oleoides*, *Chamaerops humilis* o *Smilax aspera*. Las faciaciones húmedas están enriquecidas con la presencia de alconoques (*Quercus suber*) y quejigos (*Q. broteroi*) entre otros (Rufo y Fuente, 2010a). El resto de series de vegetación ocupan las áreas mesomediterráneas colindantes

al norte de la cuenca (serie climatófila luso-extremadurensis silicícola y calcoáde mesomediterránea seca superior-subhúmeda de los bosques de *Quercus suber* con *Sanguisorba hybrida* faciación termófila silicícola de *Olea sylvestris*: *Sanguisorbo hybridae-Quercus suberis* S. y serie climatófila y edafoxerófila luso-extremadurensis silicícola mesomediterránea seco-subhúmeda de los bosques de *Quercus rotundifolia* con *Pyrus bourgaeana*: *Pyro bourgaeanae-Quercus rotundifoliae* S. faciaciones típica luso-extremadurensis y termófila mariánico-monchiquense de *Pistacia lentiscus*).

Los bosques se encuentran escasamente representados en la cuenca del Tinto debido a las múltiples actividades antrópicas que han desembocado en su degradación. Gran parte del territorio se encuentra adehesado para la explotación de ganado, repoblado con eucaliptos para la explotación maderera, o bien degradado por las actividades mineras. En estos casos, y en función del nivel de degradación, la vegetación se compone de las etapas de sustitución de los bosques: prebosques, madroñales húmedos y olivares con palmito en las localidades más secas; matorrales, principalmente brezales-tojales de *Erica australis* y *Ulex eriocladus* en zonas húmedas, con presencia de *E. andevalensis* en las áreas más ácidas y ricas en metal, o jarales-tojales de *U. eriocladus*, *Cistus ladanifer* y *C. monspeliensis* en las localidades más térmicas y secas.

En la última etapa de la serie regresiva aparecen pastizales terofíticos, dominados por la gramínea *Chaetopogon fasciculatus*. Sobre rocas sueltas se encuentran comunidades rupestres donde el dominio corresponde a *Rumex induratus*.

III.7 – Metales y Plantas en el río Tinto

El estudio de la relación entre la acidez y concentración de metales y las especies que habitan en este territorio se ha llevado a cabo por Rodríguez et al. (2005; 2007); Fuente et al. (2010) y Rufo et al. (2011). Estos trabajos se centran en el análisis de la presencia y concentración de metales en las especies que componen la flora del río. Los resultados obtenidos por estos autores indican que las especies analizadas son tolerantes a medios ácidos ricos en metales. La acumulación de metales es la estrategia menos común en la flora de río Tinto, siendo la mayoría de las plantas estudiadas en su medio natural excluidoras de Fe, Cu, Ni, Zn, As y Pb. Pese a ello, las concentraciones medidas para estos elementos exceden ligeramente los niveles considerados normales para las plantas vasculares dados por Reeves y Baker (2000) y Kabata-Pendias (2001) (Tabla 3).

Tabla 3: Concentraciones de diversos elementos y rangos de concentración (mg/kg de peso seco) esperadas para plantas vasculares (Tabla modificada de Reeves y Baker, 2000 y Kabata-Pendias, 2001). Concentraciones medias y desviaciones típicas encontradas en las plantas de la cuenca del río Tinto por Fuente et al. (2010).

Elemento	Bajo	Normal	Alto	Plantas
Ca	800	3.000-30.000	60.000	6.492 ± 7.419
Mg	400	1.000-6.000	10.000	2.734 ± 2.559
K	1.000	5.000-20.000	50.000	
Na	400	1.000-4.000	10.000 ^a	4.489 ± 14.166
P	300	800-3.000	5.000	
Fe	10	60-600	2.500 ^b	396 ± 542
Mn	5	20-400	2.000	358 ± 511
Zn	5	20-400	2.000	77,6 ± 76,6
Cd	0.03	0,1-3	20	
Pb	0.01	0,1-5	100	5,42 ± 7,95
Ni	0,2	1-10	100	2,60 ± 2,45
Co	0,01	0,03-2	20	
Cr	0,05	0,2-5	50	
As		1-1,7	20	
Cu	1	5-25	100	569 ± 594
Se	0,01	0,05-1	10	

^aLos niveles de Na en plantas que viven en zonas marítimas pueden llegar a 60.000 mg/kg.

^bLos niveles de hierro pueden alcanzar los 35.000 mg/kg en un escaso número de especies.

Se han observado valores de hiperacumulación de Fe en *Imperata cylindrica* (23450 mg/kg, Rodríguez et al., 2005) y, de acumulación en *E. andevalensis* (1417 mg/kg, Rodríguez et al., 2007).

En el caso concreto del Mn, Fuente et al. (2010) encontraron que creciendo en su medio natural algunas especies de los géneros *Erica*, *Quercus*, *Lavandula*, *Cistus*, *Genista* y *Cytisus* se pueden considerar acumuladoras de este elemento alcanzando valores de 985 mg/kg (*E. lusitanica*); 1129 mg/kg (*Q. suber*); 1853 mg/kg (*Q. rotundifolia*); 2391 mg/kg (*L. sampaiiana*); 1291 mg/kg (*L. stoechas*); 2208 mg/kg (*L. viridis*); 664 mg/kg (*C. ladanifer*); 747 mg/kg (*C. populifolius*); 711 mg/kg (*C. crispus*); 884 mg/kg (*G. polyanthos*) y 403 mg/kg (*C. eriocarpus*).

Con respecto a los elementos nutrientes, de escasez en los suelos, como se ha comentado previamente, las especies que crecen en la cuenca del Tinto presentan concentraciones consideradas normales en plantas vasculares (Tabla 3), indicando su absorción y acumulación activa por parte de las plantas.

IV – ESPECIES SELECCIONADAS

El estudio de la flora, de las dinámicas de la vegetación, y de las relaciones químicas entre las plantas y los suelos en toda la cuenca del río Tinto, permitió establecer las bases necesarias para evaluar el posible uso de especies y comunidades vegetales en diferentes modelos de restauración y otras aplicaciones biotecnológicas. Esto resultó de especial relevancia como paso previo a la selección de las especies de estudio de esta tesis.

Nerium oleander, *Cynodon dactylon* e *Imperata cylindrica* (Figura 3), tres especies presentes en los tramos alto y medio de la cuenca del río Tinto, capaces de vivir y desarrollarse tanto en los terrenos más estrictos como en las zonas con menor carga de metales pesados, con una considerable producción de biomasa y una facilidad de manejo y reproducción mayor que otras especies metalófitas de la región, son tres candidatas perfectas para su empleo en programas de restauración de territorios contaminados con metales pesados.

IV.1 - *Nerium oleander*

Nerium oleander L. (Apocynaceae) es un micro-nano fanerófito de hasta 6 metros de alto y de 2,5 a 4,5 metros de ancho, que se caracteriza por presentar un tronco robusto, de corteza lisa pardo-cenicienta. Sus hojas, linear-lanceoladas, gruesas, de margen entero y con un marcado nervio central, crecen opuestas o verticiladas en número de 3-4. Los estomas están agrupados dentro de criptas, invaginaciones de la epidermis, cubiertas con tricomas. Florece en verano, presentando grandes flores, de unos 5 cm de diámetro, con cinco pétalos de color rosa o rojo, raramente blanco, que crecen agrupadas en cimas corimbiformes en el extremo de los brotes del año. El fruto es un doble folículo de 8 a 16 cm de largo, de sección redondeada y paredes correosas que se abre por unas hendiduras laterales. Las semillas son numerosas y están cubiertas de abundantes pelos. Todas las partes de esta planta son tóxicas, incluyendo la savia.

Su franja de distribución incluye las áreas termófilas de prácticamente todos los países que rodean el Mar Mediterráneo, con la excepción de Malta y Egipto (Greuter et al., 1984-1989). L' Houérou (2003) indica su presencia en las tierras altas a ambos lados del Mar Rojo. Crece de forma natural formando bosques de ribera en la zona termomediterránea, en suelos iniciales del cauce de ríos y arroyos, así como en

corrientes o lechos de barrancos, sometidos a sequías estivales intensas (Rivas-Martínez, 2007). *N. oleander* se cultiva en todo el mundo como planta ornamental (Huxley, 1992), sobre todo en las regiones templadas y subtropicales donde crece al aire libre en parques, jardines y a lo largo de los lados de carreteras. Es una planta resistente a la sequía (Björkman y Powles, 1984; Demmig et al., 1988) y la salinidad del suelo (Abdolzadeh et al., 2008), de fácil crecimiento e identificación.

En la cuenca del río Tinto, los adelfares son una parte importante de la vegetación ribereña, principalmente en la zona minera. Es una especie característica tanto de la asociación *Oenanthe crocatae-Nerium oleander* en los lechos de cursos de aguas neutras o no extremadamente ácidas, como de su subasociación *ericetosum andevalensis* en los cursos de agua influidos por la Faja Pirítica Ibérica (Fuente et al., 2007b).

La presencia de *N. oleander* en territorios contaminados con metales hace de esta especie un buen objeto de estudio por su potencial biotecnológico. Debido a su amplia distribución y su valor ornamental *N. oleander* ha sido empleada como biomonitor de contaminación en entornos urbanos (Seward y Mashhour, 1991; Sawidis et al., 1995). *N. oleander* es un buen bioindicador de partículas atmosféricas de Pb, Fe, Cu, Mn, Cr, Al, Pt y Rd, que se depositan y son absorbidos en las hojas, o retenidos en las criptas estomáticas (Aksoy y Öztürk, 1997; Rossini y Mingorance, 2006; Fernández y Rossini, 2006; Orecchio y Amorello, 2010; Kaya et al., 2010). Respecto a la contaminación del suelo, *N. oleander* es bioindicadora de Zn y Cu, y exclusora de Al, Ba, Cr, Fe, Cd y Pb (Aksoy y Öztürk, 1997; Kadukova et al., 2006; Mingorance et al., 2007), que son absorbidos y retenidos por sus raíces. Además acumula en sus tejidos aéreos los macronutrientes Ca y Mg (Mingorance et al., 2007; Fuente et al., 2010) incluso en suelos con deficiencia de nutrientes.

IV.2 - *Cynodon dactylon*

Cynodon dactylon (L.) Pers. (Poaceae) es una gramínea perenne rizomatosa. De porte principalmente rastrero, la planta se compone de rizomas enterrados y superficiales, y tallos aéreos, cada uno originado de un único meristemo apical. Los tallos, acodados y ascendentes pueden alcanzar los 40 cm de altura, y hasta 1mm de diámetro. Los rizomas subterráneos, son blancos, gruesos y con escamas, mientras que los superficiales, son finos, verdes y presentan hojas macroscópicas. La mayor parte del sistema rizomatoso y radicular se extiende en los primeros 20 cm de profundidad del suelo (Horowitz, 1972; Rajesh y Shrivastva, 2014) con muy pocos rizomas superando los 40 cm. Las hojas son de un verde intenso, de hasta 12 cm de longitud y de 2 a 4 mm de ancho, con vainas generalmente pilosas de hasta 7 cm de largo. Las inflorescencias son espigas verticiladas que se generan en el extremo de los brotes aéreos. La producción de semillas es relevante en la colonización de nuevas áreas (Moreira, 1975), si bien el mecanismo principal de reproducción son los rizomas.

Se trata de una planta nativa del norte de África y sur de Europa, ampliamente distribuida por casi todas las áreas tropicales (Wong y Lau, 1985) y mediterráneas. Es una planta resistente que puede encontrarse en un amplio rango de condiciones edáficas y climáticas. Por lo general habita lugares abiertos y soleados con suelos húmedos ricos en nutrientes que están sometidos a perturbaciones frecuentes, tales como el pastoreo, el fuego y las inundaciones (Ellenberg, 1979; Jones, 1985; Skerman y Riveros, 1990; Hanna, 1992), si bien es tolerante al estrés salino (González y Heilman, 1977; Shukla et al., 2011) y la sequía (Kim et al., 2009; Zhao et al., 2011; Shi et al., 2012). Es una especie muy empleada en todo el mundo como forraje para el ganado, y como césped (Rivas-Goday, 1944; Harlan, 1970).

En la cuenca del río Tinto se encuentra formando parte de la asociación *Trifolium resupinati*-*Caricetum chaetophyllae*. Aparece principalmente en el estuario y las zonas de marismas, asociado a comunidades de plantas herbáceas, si bien también forma parte de las series de sustitución de las zonas más degradadas y secas de la fresneda en la vegetación de rivera y bancos de arena del cauce en los tramos alto y medio de la cuenca.

C. dactylon es una especie pionera en entornos piríticos (Osaliya et al., 2011) y en terrenos contaminados con metales, tales como minas de Pb/Zn (Shu et al., 2002), de Cu (Yang y Gao, 2001), de Mn (Yan et al., 2006; Li et al., 2007), y otras minas polimetálicas y terrenos contaminados de Asia (Wong y Lau, 1985; Mukhtar et al., 2013) y África (Jonnalagadda y Nenzou, 1997; Boularbah et al., 2006; Anoliefo et al., 2008). En los tejidos de las poblaciones que se desarrollan en estos entornos pueden encontrarse altas concentraciones de Cr, Cd, Pb, Zn, Cu, Fe y As (Jonnalagadda y Nenzou, 1997; Jonnalagadda et al., 2002; Madejón et al., 2002; Shu et al., 2002; Boularbah et al., 2006; Li et al., 2006; Wu et al., 2010; Chaterjee et al., 2011; Mukhtar et al., 2013), en ocasiones por encima de los niveles considerados fitotóxicos (Kabata-Pendias, 2001), sin presentar síntomas de toxicidad. Es por tanto una especie co-tolerante a múltiples metales pesados. Consigue esta tolerancia siguiendo una estrategia de exclusión para el As, Pb, Zn, Cd y Cu, evitando la absorción y reteniendo la mayor concentración de los metales en su parte subterránea (Wu et al., 2010). También es considerada hiperacumuladora de Cr (Chaterjee et al., 2011).

Estas características de resistencia la convierten en una especie muy interesante para el estudio de su uso en técnicas de fitorremediación, revegetación e inmovilización de metales en entornos contaminados, por lo que se ha empleado en restauración de minas de Pb-Zn (Shu et al., 2003) y Cu (Yang y Gao, 2001; Wang et al., 2004) en China, fitorremediación de Cr en Tailandia (Sampanpanish et al., 2006), en la construcción de humedales artificiales para la revegetación de terrenos piríticos en Uganda (Osaliya et al., 2011).

IV.3 - *Imperata cylindrica*

Imperata cylindrica (L.) P. Beauv. es una especie perenne de la familia Poaceae. Sus hojas, de entre 40-90 cm de longitud y 2 cm de ancho, son verdes o amarillentas, con el margen finamente serrado y una marcada costilla media ligeramente desplazada del centro de la hoja. Estas hojas crecen generalmente agrupadas en racimos compactos que nacen a ras de suelo de los nodos del rizoma. Tiene un sistema rizomatoso muy desarrollado, que supone al menos el 60% de la biomasa total de la planta (Sellers et al., 2012). El rizoma, muy ramificado y de extremo punzante, puede alcanzar una profundidad de más de 50 cm (MacDonald et al., 2006). Las espigas son blancas y plumosas, y pueden contener hasta 3000 semillas.

Nativa del sudeste de Asia, Australia, China, Japón y Filipinas, pero ampliamente distribuida en toda el área mediterránea. Es una planta heliófila, muy resistente tanto a sequías como a inundaciones (King y Grace, 2000) que se desarrolla en una gran variedad de suelos, de fuertemente ácidos a ligeramente alcalinos, siendo muy común en ecosistemas alterados (Johnson y Shilling, 1998; Mekonnen, 2000).

En la cuenca del río Tinto forma parte de la asociación *Imperato cylindricae-Scirpetum holoschoeni*, representando el ecosistema de pradera-juncal en los pastizales de ribera de cauces de aguas tanto rojas como claras que sufran fuertes sequías, en cauces de pequeña entidad y en bancos arenosos removidos temporalmente húmedos (Rufo y Fuente, 2011).

I. cylindrica es hiperacumuladora de Fe. Los especímenes que crecen en el río Tinto presentan más del 1% de su peso seco correspondiente a este metal (23450 mg/kg de peso seco, Rodríguez et al., 2005). El Fe se encuentra principalmente distribuido en la raíz y el rizoma, biomineralizado en forma de jarosita (50%) y ferritina-ferrhidrita (50%). En las hojas no se produce la formación de jarosita, si bien si están presentes los depósitos de ferritina-ferrhidrita (Rodríguez et al., 2005; Amils et al., 2007; Fuente et al., 2012). *I. cylindrica* es además una planta tolerante a altas concentraciones de Pb, Cu, Zn, Sn, Cr, Ni, Co y Mn (Peng et al., 2006; Yan et al., 2006; Li et al., 2007; Paz-Alberto et al., 2007; Ashraf et al., 2011; Abidemi, 2013) principalmente restringiendo la absorción y translocación de éstos a sus partes aéreas (Peng et al., 2006).

La gran resistencia de *I. cylindrica* hace que sea una especie difícil de controlar, reproduciéndose con facilidad en todo tipo de ecosistemas como una especie dominante. Si bien con el control adecuado, su tolerancia a los metales pesados y gran desarrollo de su sistema rizomatoso la convierten en una interesante especie para estabilizar terrenos contaminados con metales.



Figura 3: A: *Nerium oleander*. B: *Imperata cylindrica*. C: *Cynodon dactylon*

La presencia de *N. oleander* como especie característica de la vegetación tanto en entornos de aguas rojas como de aguas claras motivó el primer trabajo presentado. Este artículo se centró en la búsqueda de diferencias en la concentración total de metales y su localización, en los tejidos de especímenes de *Nerium oleander* recolectados en los tramos alto y medio de la cuenca del río Tinto. Para ampliar los conocimientos sobre la absorción de los metales en las primeras fases del desarrollo de *N. oleander* se llevó a cabo el experimento de laboratorio que recoge el segundo artículo, sometiendo a plántulas de adelfas procedentes de semillas de ambas comunidades a condiciones que simulan las más extremas condiciones que podemos encontrar en el núcleo minero de la cuenca.

En el tercer artículo se llevó a cabo el estudio de acumulación sobre *C. dactylon* procedente de las riberas de aguas rojas del río. En esta ocasión, el estudio se centró en el Fe, el elemento mayoritario en todo el área de estudio, que alcanza los valores más altos en plantas de la región, y cuya biomineralización es conocida para otras gramíneas. Se hizo hincapié en las diferencias de distribución del Fe entre las distintas partes de la planta, y en la localización de los minerales de Fe observados.

Las observaciones previas sobre la acumulación y biomineralización de Fe en *Imperata cylindrica*, junto con los resultados obtenidos en el experimento de *C. dactylon* motivaron la realización de un ensayo de laboratorio que permitiese observar la dinámica de acumulación de Fe en los diferentes tejidos de *I. cylindrica*, su distribución en las diferentes partes de la planta, así como intentar reproducir las formas de biomineralización de Fe que se observan en los especímenes en sus comunidades naturales. Este estudio se recoge en el capítulo de la tesis pendiente de publicación. Las observaciones de microscopía revelaron la presencia de biominerales de silicio en diferentes estructuras en el interior de los tejidos de raíz, rizoma y hoja de la planta. Estos biominerales de Si han sido ampliamente descritos en numerosas especies de gramíneas (Lanning y Eleuterius, 1989; Laue et al., 2007), y en ocasiones se ha relacionado el Si como mecanismo de tolerancia ante el estrés abiótico en plantas (Nwugo y Huerta, 2008; Feng et al., 2010). Un estudio de las distintas formaciones y concentraciones de silicio en *I. cylindrica* se expone en el último artículo de esta tesis.

V – OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es evaluar el papel que pueden desempeñar estas tres especies tolerantes en posibles programas de descontaminación o restauración de entornos mineros. Para una correcta evaluación de cada especie, la caracterización química de las plantas es de especial interés, así como el estudio de la capacidad de absorción, y la localización y caracterización de las acumulaciones de los metales en los diferentes tejidos, lo que nos indica la forma en la que la planta almacena y/o aísla el exceso de concentración de los metales. Por ello, en base al interés que representan estas tres especies, los objetivos de esta tesis han sido:

Determinar la distribución y caracterización de los metales en *N. oleander*, *C. dactylon* e *I. cylindrica* procedentes de un entorno metalífero extremadamente ácido como son los tramos alto y medio de la cuenca del río Tinto.

Comparar, en el caso de *N. oleander*, los individuos de comunidades acidófilas con los individuos de comunidades de aguas claras en busca de mecanismos de adaptación que los diferencien como ecotipos.

Comprobar el comportamiento de estas especies y cuantificar su capacidad de acumulación de los metales que encontramos de manera mayoritaria en la cuenca del río Tinto, con especial interés en el Fe, sometidas a experimentos bajo condiciones controladas.

Finalmente evaluar el uso de estas especies en proyectos de restauración de entornos mineros o contaminados con metales pesados, en base a sus capacidades de bioindicación, fitoestabilización o fitoextracción.

MATERIALES Y MÉTODOS

I - MATERIAL VEGETAL

El material se recolectó en comunidades que crecen junto a diferentes cursos de aguas rojas y claras en el tramo alto de la cuenca del río Tinto. Los puntos de muestreo se representan en el siguiente mapa:

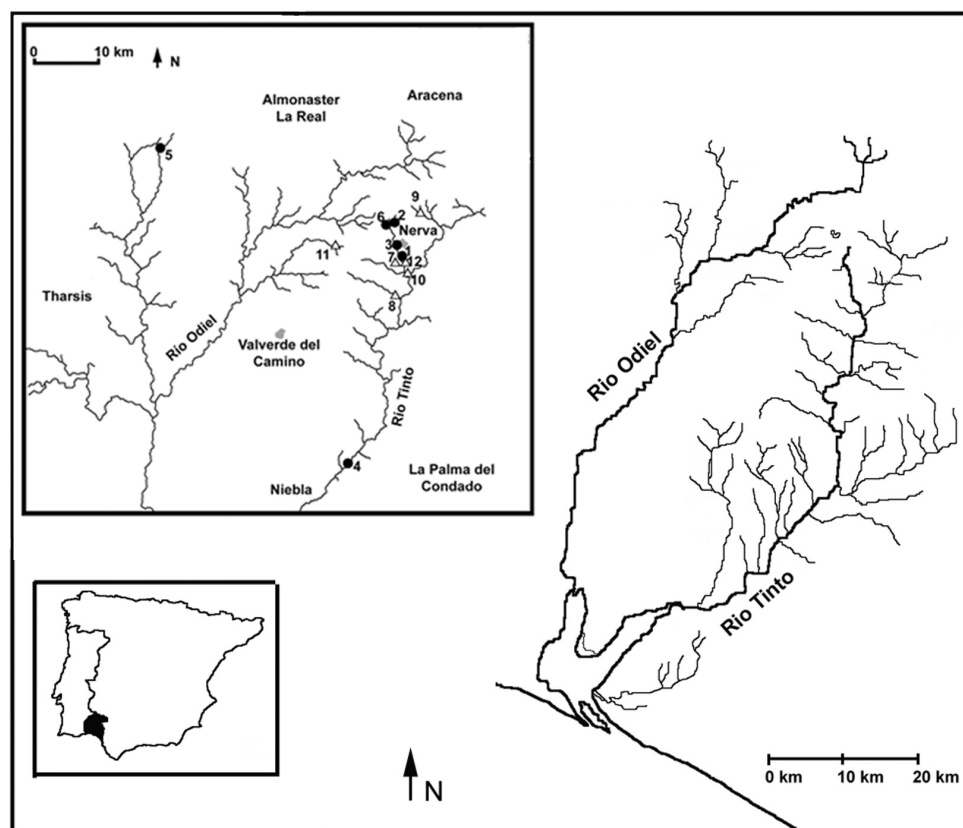


Figura 4: Localización de los puntos de muestreo en cursos de agua extremadamente ácida (EA) (círculos negros): Huelva, España: 1. 29SQB1573; 2. 29SQB1678; 3. 29SQB1574; 4. 29SQB1044; 5. 29SPB7985; 6. 29SQB1578; y agua menos ácida (LEA) (triángulos): Huelva, España: 7. 29SQB1573; 8. 29SQB1664; 9. 29SQB1879; 10. 29SQB1672; 11. 29SQB0675; 12. 29SQB1672.

Se recolectaron hojas y raíces de plantas adultas de *Nerium oleander*, y frutos para extraer las semillas empleadas en el experimento de laboratorio. También se recogieron especímenes completos de *Cynodon dactylon* e *Imperata cylindrica*. Se separaron rizomas que se dejaron crecer en un invernadero para obtener las plantas necesarias para los experimentos correspondientes. El material seleccionado para análisis se conservó en un congelador a -20°C hasta su uso. Previamente a los análisis químicos, las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron en una estufa a 75°C durante 24h.

Para llevar a cabo los procedimientos experimentales en cultivo hidropónico, descritos en sus correspondientes artículos, se emplearon las siguientes disoluciones:

Para el tratamiento de *N. oleander* se empleó una solución artificial de diseño propio basado en la composición rica en metales y escasa en nutrientes de las aguas del río Tinto en sus tramos más ácidos, ajustada a un pH=1,8 empleando H₂SO₄ [1M]. La composición de esta solución está representada en la Tabla 4.

Tabla 4: Composición de la solución artificial

Reagent	Metal concentration
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2,300 mg/kg (Fe)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	327 mg/kg (Mg)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	257 mg/kg (Cu)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	114 mg/kg (Zn)
Mn(SO ₃) ₂ ·4H ₂ O	55 mg/kg (Mn)
KCl+KBr	7 mg/kg (K)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	6 mg/kg (Co)
NiSO ₄ ·6H ₂ O	2 mg/kg (Ni)
CrCl ₃ ·6H ₂ O	1 mg/kg (Cr)
KBr	1 mg/kg (Br and K)

En el tratamiento de *C. dactylon* se utilizó una solución nutritiva Hoagland modificada (Tabla 5) a la que se añadieron 500 mg/kg de Fe (en forma de Fe²⁺) y cuyo pH se ajustó a 2 añadiendo H₂SO₄ [1M] para mantener el Fe en disolución.

Tabla 5: Composición de la disolución Hoagland modificada

Reactivo	Solución
KH ₂ PO ₄	1 ml/L [1M]
KNO ₃	5 ml/L [1M]
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	5 ml/L [1M]
MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 ml/L [1M]
μ-nutrientes	1 ml/L
FeSO ₄ · 7H ₂ O	500 mg/kg (Fe)

Para tratar *I. cylindrica*, se utilizó nuevamente disolución Hoagland modificada, con la misma composición, añadiéndose esta vez 300 mg/kg de Fe (en forma de Fe²⁺) y ajustando el pH a 3 también con H₂SO₄ [1M].

II - TÉCNICAS EMPLEADAS

Existen diversas técnicas empleadas en el estudio de acumulación en plantas que nos permiten llevar a cabo los objetivos propuestos. En esta tesis se aúna una técnica de cuantificación elemental para obtener la concentración, en mg/kg de peso seco, de los metales y otros elementos estudiados, con técnicas de microscopía para localizar la distribución de los elementos en los diferentes tejidos de las muestras.

II.1 - Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

Se trata de una técnica para la determinación cuantitativa multielemental de gran sensibilidad que permite la obtención de concentraciones en rangos de ng/g e incluso pg/g, con un error del 15%. El material de la muestra se introduce en una antorcha de plasma de argón de alta energía. En el plasma, el material se atomiza. Al continuar absorbiendo energía, estos átomos pierden un electrón y se convierten en iones con carga positiva. Posteriormente, el haz de iones generado entra en el analizador de masas donde se separan en base a su relación de masa a carga. Cada elemento tiene sus propios isótopos característicos y masas y por lo tanto producirá su propio espectro de masas. El detector permite mediciones simultáneas de señales altas y bajas con lo que se consigue la detección simultánea de los componentes principales y los elementos ultra-traza en una sola pasada.

Las muestras deben ser introducidas a la antorcha en forma gaseosa o de aerosol, por lo que las muestras sólidas requieren una digestión y posterior nebulización del líquido resultante. El factor que determina la calidad de la medida es la eficiencia del proceso de digestión de las muestras. Algunos estudios analizan diferentes protocolos para obtener el proceso más eficiente en la digestión de material vegetal, como el descrito por Zuluaga et al. (2011). Este protocolo obtiene una recuperación óptima de un gran número de elementos en un solo análisis semicuantitativo (Total Quant) y por tanto ha sido el seleccionado para la realización de esta tesis.

Una muestra aproximada de 500 mg de cada planta a analizar se colocó en un tubo de Teflón para su digestión ácida en una mezcla de 8 mL de HNO₃ al 65% y 2 mL de H₂O₂ al 30% dentro de un digestor de microondas MLS Ethos 1600 URM Milestone de alta presión, siguiendo el protocolo descrito por Zuluaga et al. (2011). Posteriormente se ajustó el volumen de cada muestra a 25mL con agua desionizada y las alícuotas

resultantes se analizaron mediante un instrumento ICP ELAN-6000 PE Sciex (Toronto, Ontario, Canadá).

Mediante esta técnica se obtuvieron las concentraciones, en mg/kg referenciadas al peso seco de la muestra digerida, de todo el espectro elemental. De este espectro se seleccionaron los metales y nutrientes con la mejor recuperación según el protocolo propuesto para cada uno de los experimentos. Las muestras se separaron según el material disponible para alcanzar la cantidad mínima de peso seco requerida. *C. dactylon* e *I. cylindrica* se separaron en raíz, rizoma y hoja. De *N. oleander* adulta se analizaron muestras de hoja y raíz. Obteniendo la concentración por separado de las diferentes partes, puede calcularse la relación del metal entre la parte aérea y las raíces y/o rizomas (coeficientes de translocación, TC). Este coeficiente es fundamental para caracterizar el tipo de adaptación que tiene la planta, indicando si ésta transloca el metal a su parte aérea, o bien lo aísla en su parte subterránea, contrastándola con las concentraciones de los suelos y concentraciones normales para plantas vasculares.

En el experimento con plántulas de *N. oleander* cultivadas se analizó la plántula entera al no disponer de peso seco suficiente de sus partes por separado.

II.2 - Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

El microscopio electrónico de barrido (SEM) permite la observación y caracterización de muestras sólidas orgánicas e inorgánicas a escala nanométrica. Para ello utiliza un haz concentrado de electrones de alta energía para generar una variedad de señales en la superficie de las muestras sólidas. El haz de electrones recorre la superficie de la muestra, interactuando con los átomos de una sección de volumen cuya profundidad depende de la intensidad del haz. Los tipos de señales que se derivan de las interacciones electrón-muestra, que incluyen electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos-X característicos, y otros fotones de diferente energía, revelan información acerca de la muestra, como su morfología externa (textura), composición química, estructura cristalina y la orientación de los materiales que la componen. El único requisito es que el objeto a escanear presente buena conductividad. Para favorecer la conductividad eléctrica y prevenir las cargas producidas por el chorro de electrones procedente del microscopio las muestras se recubren con una capa delgada de material conductor, comúnmente de carbono, oro, o algún otro metal o aleación.

Un detector obtiene las señales emitidas por la sección escaneada de la muestra, y genera una imagen digital de 2 dimensiones que muestra las variaciones espaciales en estas propiedades, la cual es representada en un ordenador. Para las muestras de imagen, se utilizan principalmente detectores de electrones secundarios (SE) y electrones retrodispersados (BSE): los electrones secundarios son más relevantes para representar la morfología y la topografía de las muestras, y los electrones retrodispersados son más valiosos para ilustrar contrastes en la composición en muestras de múltiples fases en base a su densidad atómica.

Para el estudio de las superficies, las muestras se colocaron directamente sobre los portas. Para el estudio del interior de los tejidos, se realizaron cortes longitudinales y transversales de las muestras, con micrótopo y sin tratamiento previo, con el objetivo de no alterar la presencia de metales y facilitar su observación. La observación de los tejidos se realizó con protocolos habituales en el estudio de metales en material vegetal (Berazaín et al., 2007a y b; Rodríguez et al., 2007; Amils et al., 2007; Fuente et al., 2012)

Los cortes realizados se colocaron directamente sobre los portas. Los portas están cubiertos por una superficie adherente de grafito conductivo. Una vez preparados con las correspondientes muestras, se metalizaron con una capa de oro de 10nm de espesor en un metalizador BIO-RAD SC 502. Posteriormente las muestras se examinaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N (Japón), empleando un voltaje de aceleración de 20 kV y una distancia de trabajo de 15 mm. Durante los análisis la temperatura de las muestras era equivalente a la temperatura de la habitación.

Los tejidos seleccionados para su observación (Figura 5) fueron: hoja (cutícula, epidermis, tricomas, parénquimas y tejido vascular), tallo en *N. oleander* y rizoma en *C. dactylon* e *I. cylindrica* (epidermis, cortex, cilindro central y médula) y raíz (epidermis, cortex, endodermis y cilindro central). Todos los órganos se observaron tanto en superficie como en su interior.

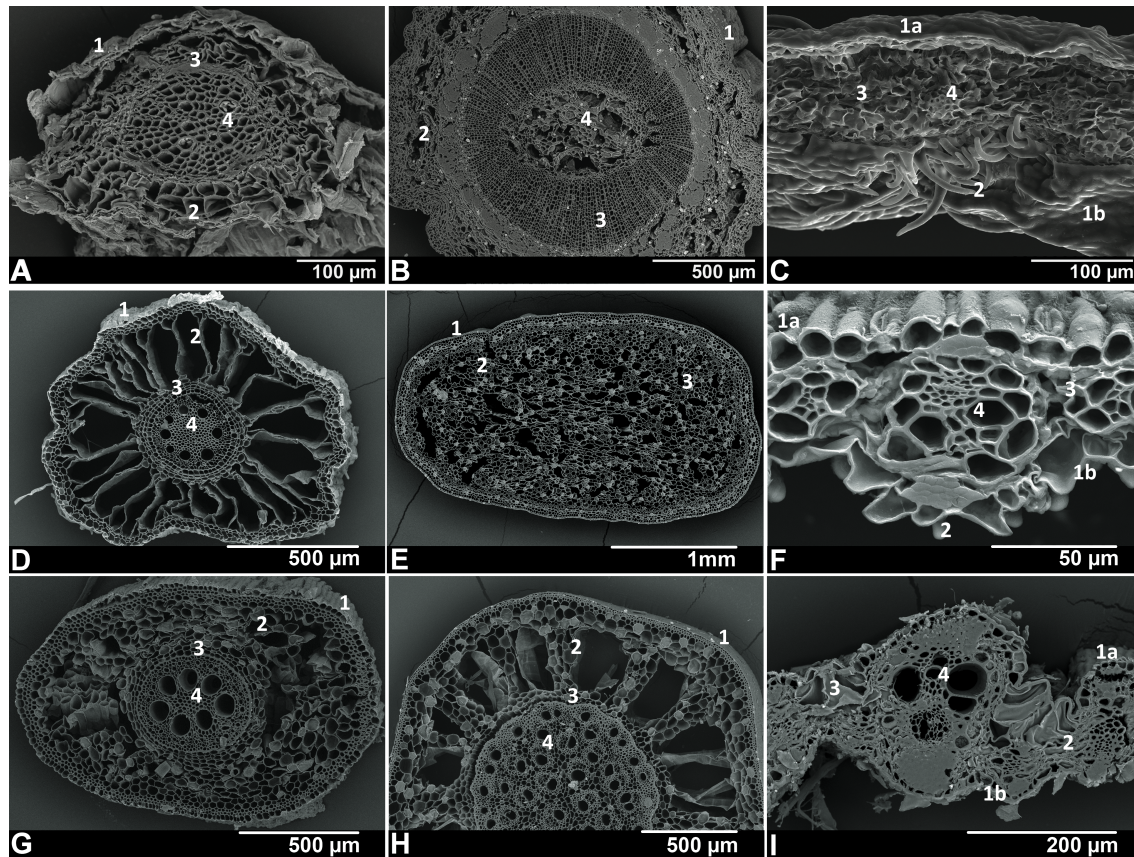


Figura 5: Tejidos analizados de los distintos órganos de las tres especies seleccionadas. *Nerium oleander*: **A** Raíz (1 epidermis; 2 cortex; 3 endodermis; 4 cilindro central), **B** Tallo (1 epidermis; 2 cortex; 3 cilindro central; 4 médula), **C** Hoja (1a epidermis adaxial; 1b epidermis abaxial; 2 cavidad estomática con tricomas; 3 parénquimas del mesófilo; 4 haz vascular). *Cynodon dactylon*: **D** (1 epidermis; 2 cortex; 3 endodermis; 4 cilindro central), **E** Rizoma (1 epidermis; 2 cortex, 3 cilindro central), **F** Hoja (1a epidermis adaxial; 1b epidermis abaxial; 2 tricomas; 3 parénquimas del mesófilo; 4 haz vascular). *Imperata cylindrica*: **G** Raíz (1 epidermis; 2 cortex; 3 endodermis; 4 cilindro central), **H** Rizoma (1 epidermis; 2 cortex; 3 endodermis; 4 cilindro central). **I** Hoja (1a epidermis adaxial; 1b epidermis abaxial; 2 parénquimas del mesófilo; 3 células buliformes; 4 haz vascular).

II.3 - Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

La microscopía electrónica de transmisión se basa en los mismos principios que la microscopía óptica, pero en lugar de luz emplea un haz de electrones, con una longitud de onda más corta que permite obtener una resolución mucho mayor. El haz de electrones debe atravesar la muestra, por lo que la sección introducida ha de ser muy fina (del orden de 0,2 μm). Dependiendo de la densidad del material que atraviesen, algunos de los electrones se dispersan, desapareciendo del haz. Los electrones que no se han dispersado llegan a una pantalla fluorescente, que representa en una imagen la distribución de la intensidad del propio haz tras interactuar con los átomos del espécimen. Esta imagen es capturada por una cámara.

Pequeñas secciones (1mm³) de las muestras de *Imperata cylindrica* se fijaron en paraformaldehído (4%) y glutaraldehído (2%) en un buffer de cacodilato (0.05M, pH 7.4) durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las muestras se lavaron tres veces usando el mismo tampón y se realizó una post-fijación con OsO₄ al 1% en agua durante 30 minutos en la oscuridad. Después de tres lavados en agua bidestilada las muestras se incubaron durante una hora en una solución acuosa al 2% de Uranyl acetato, se lavaron nuevamente y se sometieron a un proceso de deshidratación en etanol a diferentes concentraciones: 30% (20 min), 50% (20 min), 70% (20 min), 90% (2 x 20 min) y 100% (2 x 30 min). Para completar la deshidratación se empleó una mezcla 1:1 de etanol y óxido de propileno (10 min), y óxido de propileno puro (3 x 10 min). La inclusión en resina se llevó a cabo con una mezcla 1:1 de óxido de propileno : Epon durante 45 minutos y dejándolo durante la noche en resina Epoxy pura (Resina TAAB 812; TAAB Laboratories, Berkshire, Inglaterra). La polimerización de las muestras incluidas se hizo a 60° durante 2 días. Las secciones ultrafinas de la muestra se tiñeron con uranyl acetato y citrato de plomo siguiendo procedimientos estándar.

Las muestras se examinaron a 80Kv en un microscopio electrónico Jeol JEM-1010 (Tokyo, Japon) (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid) y a 200Kv en un microscopio electrónico JEM 2000FX (Tokyo, Japan) (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Madrid) equipado con un microanalizador de Energía Dispersiva de Rayos-X LINK ISIS 300 (Oxford, Inglaterra).

II.4 - Energía Dispersiva de Rayos X (EDX)

Aparte de la visualización micromorfológica, la utilización de un equipo EDX acoplado tanto al SEM como al TEM, permite captar los rayos-X característicos emitidos por los átomos de la muestra cuando sus electrones excitados tras ser bombardeados por el haz de electrones vuelven a estados de menor energía. Estos rayos-X son de una longitud de onda fija, relacionada con la diferencia de energía entre los electrones de diferentes orbitales para un elemento dado, con lo que se puede obtener un espectro de la composición química elemental del tejido analizado.

Este análisis tiene un límite de detección igual al 10% del elemento principal en la muestra. Además, es capaz de detectar elementos ligeros como el C. Los datos semicuantitativos numéricos obtenidos en el análisis están referidos por defecto al mayor pico obtenido en cada espectro, que en nuestras muestras, al ser de origen orgánico, suele corresponder generalmente al C.

Los análisis EDX realizados en ambas técnicas de microscopía descritas se llevaron a cabo siempre sobre material seco, sin ningún tipo de tratamiento químico previo para evitar la disolución y pérdida de los elementos.

La combinación de éstas técnicas permite la localización visual de los lugares de preferencia de concentración de metales en el interior de los tejidos, dando una idea de su abundancia, densidad y posibles formas de cristalización de estas acumulaciones, así como detectar la presencia de otros elementos, en mayor o menor abundancia, que no han sido correctamente medidos por las limitaciones del análisis químico elemental por ICP-MS.

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

I - *Nerium oleander*

El primer trabajo aborda el estudio comparativo de la acumulación y distribución de Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, Pb, Ba, Sr, As y Ni entre las poblaciones de *N. oleander* de los diferentes cursos de agua del río Tinto. No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de los elementos estudiados de los individuos de *N. oleander* creciendo de forma natural en cauces de aguas extremadamente ácidas (EA) con respecto a los procedentes de cursos de aguas menos ácidas (LEA) (Tabla 6). Los individuos de ambas comunidades acumulan los macronutrientes Ca, Mg y K en todos sus órganos en concentraciones consideradas normales para plantas vasculares pese a su escasez en los suelos de la región, y para todos ellos las plantas presentan coeficientes de translocación (TC) superiores a 1, indicando su transporte y concentración preferente en las partes aéreas.

Tabla 6: Concentraciones medias (M) en mg/kg de peso seco y desviaciones típicas (SD) de raíces (R) y hojas (L) de *N. oleander* procedente de comunidades de aguas extremadamente ácidas (EA) y aguas menos ácidas (LEA), y coeficientes de translocación (TC). $n = 6$.

			Ca	Mg	K	Na	Fe	Zn	Mn	Cu	Pb	Ba	Sr	As	Ni
R	EA	M	12,780	3478	3864	3172	5663	45.9	151	37.2	50.8	273	12.0	13.6	6.37
		SD	4906	3264	773	2797	8150	25.4	167	45.1	25.0	388	8.72	7.14	7.39
R	LEA	M	14,267	1466	5212	1671	2145	68.5	127	116	77.8	63.5	15.6	7.86	7.45
		SD	3274	1240	3700	354	1882	49.1	82.0	135	80.0	77.9	4.57	8.92	5.36
L	EA	M	16,498	3641	4762	183	257	89.9	519	24.8	4.78	10.8	26.7	1.63	14.4
		SD	3957	633	2138	121	97.1	47.9	430	15.1	3.59	7.31	3.68	1.64	11.1
L	LEA	M	16,354	3717	8314	46.9	205	29.5	120	7.31	2.91	31.3	23.7	0.444	2.49
		SD	4493	1273	5519	15.6	13.7	4.70	62.8	5.48	3.48	11.0	6.19	0.434	1.84
	EA	TC	1.29	1.05	1.23	0.06	0.05	1.96	3.44	0.67	0.09	0.04	2.23	0.12	2.26
	LEA	TC	1.15	2.54	1.60	0.03	0.10	0.43	0.94	0.06	0.04	0.49	1.52	0.06	0.33

Los valores de concentración obtenidos para el Fe, Pb, As y Cu superan los valores normales para plantas vasculares en las raíces de ambos grupos de plantas, sin embargo, ninguno de éstos elementos supera dichos valores en las hojas de *N. oleander*. Los TC obtenidos para todos estos metales son en general muy inferiores a 1, indicando su concentración preferente en raíces. Según los datos publicados por Fuente et al. (2010), las adelfas del río Tinto presentan índices biológicos de absorción (relación establecida entre las concentraciones de un elemento en la planta con respecto a la correspondiente a su suelo) inferiores a la unidad para estos elementos. Por lo tanto, se puede afirmar que *N. oleander* creciendo de forma natural en los cauces del Tinto actúa como exclusora de Fe, Pb, As y Cu.

El estudio de microscopía SEM sobre los distintos órganos y tejidos de *N. oleander* (Figuras 6 y 7) revela la presencia de una placa de Fe en la superficie de la raíz y del tallo subterráneo. Esta placa se compone de Fe, Si y Al. Dicha composición concuerda con la publicada para las placas de Fe en raíces encontradas en otras especies como *Phragmites australis* (Batty et al., 2000), aunque los elementos acompañantes del Fe pueden variar de unas especies a otras y dependiendo, entre otros factores, de los elementos presentes en los suelos, su pH, capacidades red-ox y el contenido en materia orgánica (Mendelssohn et al., 1995). La formación de la placa de Fe está bien documentada en plantas helófitas, principalmente gramíneas, pero hasta ahora no existían datos publicados referente a su formación en *N. oleander*. Se considera que la principal función de esta placa es la de actuar como filtro, reteniendo el exceso de Fe y otros metales pesados (Taylor y Crowder, 1983; Taylor et al., 1984; Crowder y St.-Cyr, 1991). Según las observaciones realizadas, la placa de *N. oleander* presenta inclusiones de otros elementos, como As y Pb en las plantas que crecen en los cauces de aguas extremadamente ácidas, o Mn y Zn en las plantas procedentes de cauces de aguas menos ácidas. La acumulación de estos elementos en la placa concuerda con los resultados previamente comentados sobre las concentraciones de estos metales en las raíces y sus bajos coeficientes de translocación. Por tanto, este hecho parece corroborar la formación de la placa de Fe como mecanismo de retención de metales en *N. oleander*.

Las observaciones realizadas en el interior de la raíz indican que la primera capa de células de la epidermis contiene depósitos minerales con la misma composición encontrada en la placa de Fe. Taggart et al. (2009) también encuentran indicios de que las partículas de arsenatos que aparecen en la placa de hierro de *Typha domingensis* se han formado en el interior de la raíz. Estos datos nos sugieren que la biomineralización interna juega un papel importante en la formación de la placa.

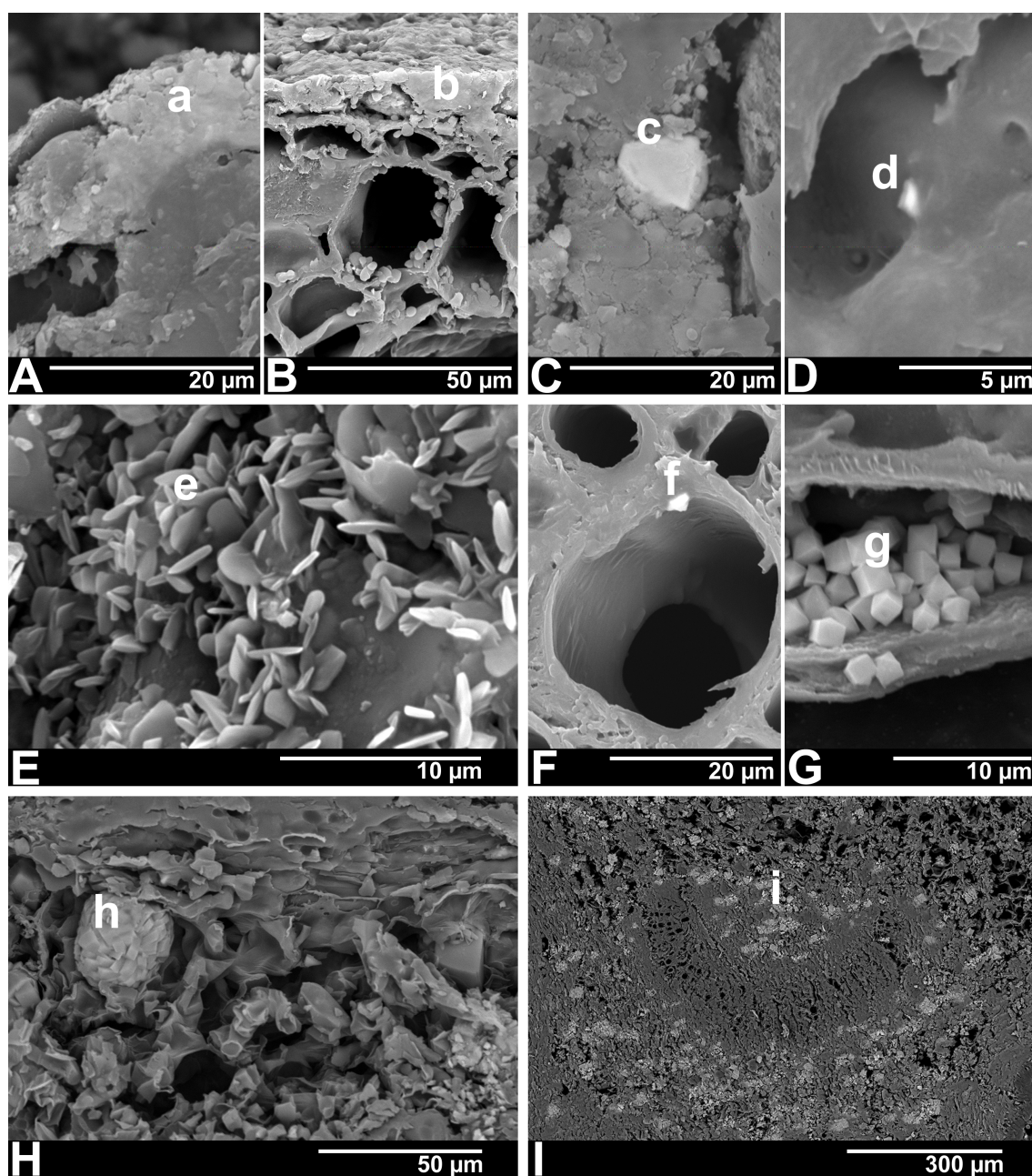


Figura 6: Fotografías representativas de *N. oleander*. **A** Placa de hierro sobre la superficie de raíz. **B** Placa de hierro en la superficie de la raíz. **C** Detalle de la placa de hierro de la raíz. **D** Inclusión de Fe en el cortex de la raíz. **E** Partículas de Fe en la superficie del tallo. **F** Inclusión de Fe en el cilindro central del tallo. **G** Cristales prismáticos de Ca en el cortex del tallo. **H** Drusa de Ca en el mesófilo de la hoja. **I** Cristales de Ca en el peciolo. **A**, **C-E** e **I** pertenecen a plantas de aguas extremadamente ácidas (EA). **B** y **F-H** son de plantas de aguas menos ácidas (LEA). Las letras en minúscula corresponden a los espectros EDX representados en la Figura

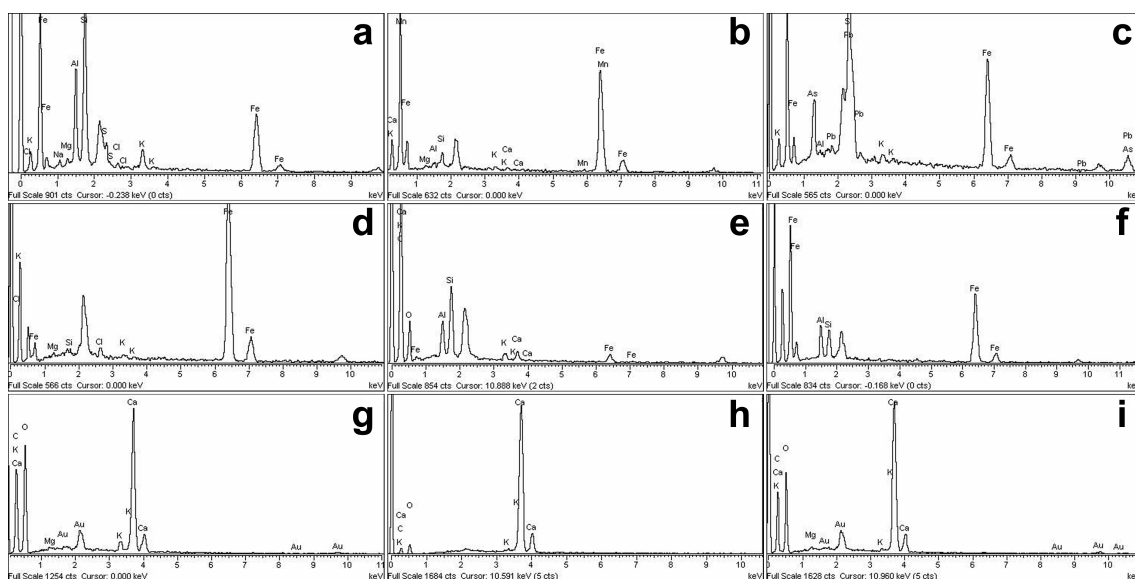


Figura 7: Espectros EDX de *N.oleander* correspondientes a la Figura 6. **a–c** Composición de la placa de hierro de plantas EA y LEA. **d** Inclusión de Fe en la raíz. **e** Composición de la placa de Fe en el tallo de plantas EA. **f** Inclusión de Fe, Si y Al en el tallo. **g–i** Diferente composición de cristales de Ca.

En el cortex de las raíces y en todos los tejidos analizados del tallo, aparecen cristalizaciones de Fe, incluidas en las paredes de las células. Además de las diversas acumulaciones de metales pesados, en el análisis de microscopía también se observó una gran densidad de drusas y cristales prismáticos de Ca que se encuentran en el cortex de los tallos y, sobre todo, en las hojas y peciolos. La formación de drusas de oxalato cálcico es un mecanismo de reserva de Ca en plantas vasculares, principalmente dicotiledóneas (Volk, 2002; Nakata, 2003), y además es conocida su función como mecanismo de detoxificación de metales pesados divalentes (Mazen, 2004).

En el segundo trabajo nos centramos en comparar las capacidades de absorción y acumulación de Fe, Cu, Zn, Mn y Mg en los primeros estadios de desarrollo de *N. oleander*, comparando los resultados en plántulas procedentes de semillas de ambas poblaciones, sometidas a un experimento bajo condiciones controladas, en un cultivo hidropónico, empleando una solución artificial de diseño propio que simula las aguas más ácidas del río Tinto. Los resultados del experimento nos indican que los dos grupos de plántulas no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) en los valores de concentración alcanzados al final del periodo experimental para ninguno de los metales estudiados. No obstante, las diferencias existentes a lo largo del tratamiento señalan que cada grupo presenta un patrón de absorción diferente. Las plántulas procedentes de comunidades de aguas menos ácidas (LEA) reducen bruscamente la absorción de metales a partir de la primera semana, mientras que las plantas procedentes de comunidades de aguas extremadamente ácidas (EA) mantienen una absorción lineal, proporcional a la concentración de metal añadida en la disolución (Tabla 7). Este patrón se repite sin diferencias en todos los metales para cada tipo de plántulas (Figuras 8 y 9).

Las concentraciones de Fe, Cu, Mn y Zn obtenidas al finalizar el experimento sobrepasan los valores normales para plantas vasculares, alcanzando concentraciones consideradas de hiperacumulación en el caso del Fe y Cu. Con la excepción del Ca, que no fue añadido con la solución artificial para simular la escasez de nutrientes del medio original, la concentración de todos los elementos estudiados exceden las concentraciones que observamos en los individuos que crecen en su entorno natural estudiados previamente.

Tabla 7: Concentración añadida en la disolución (C), ratio de absorción semanal en mg/kg p.s. en las plantas de aguas rojas para el primer (V1) y el segundo (V2) periodo.

Metal	C	V1	Ratio V1/C weeks 0 to 3	V2	Ratio V2/C weeks 4 to 7
Fe	2,300	9,516	4.14	9,955	4.33
Cu	257	959	3.73	1,109	4.31
Mn	55	169	3.07	240	4.36
Zn	114	397	3.48	396	3.47
Mg	327	1,171	3.58	1,173	3.59

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

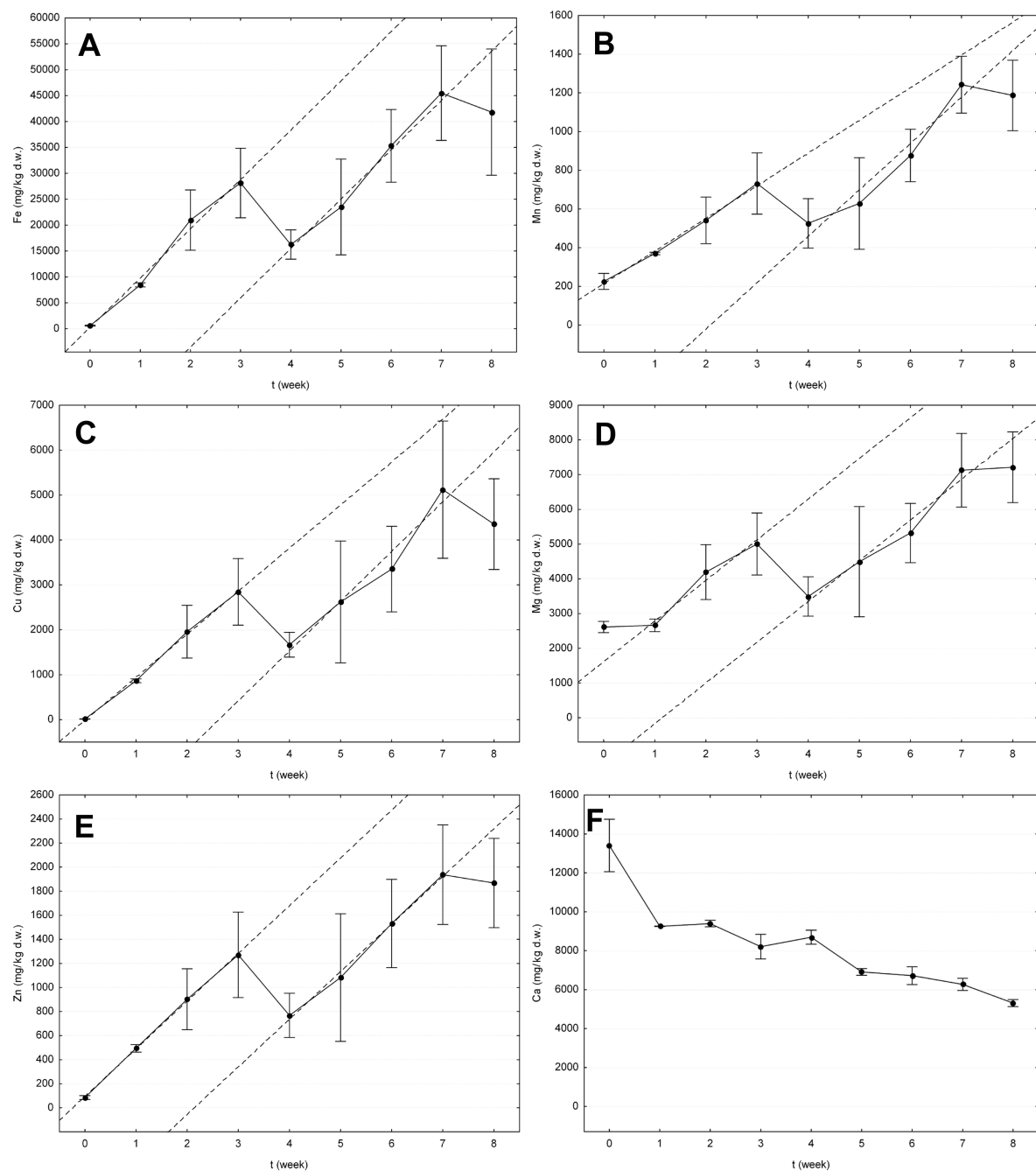


Figura 8: Representación gráfica de las concentraciones (mg/kg p.s.) medias ($n=3$) de Fe (A), Mn (B), Cu (C), Mg (D), Zn (E) y Ca (F) frente al tiempo (semanas) de los individuos de *N. oleander* procedentes de aguas extremadamente ácidas (EA). Los puntos indican las medias y los bigotes representan el error estándar. Las líneas discontinuas representan el ajuste lineal para cada periodo de 4 semanas.

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

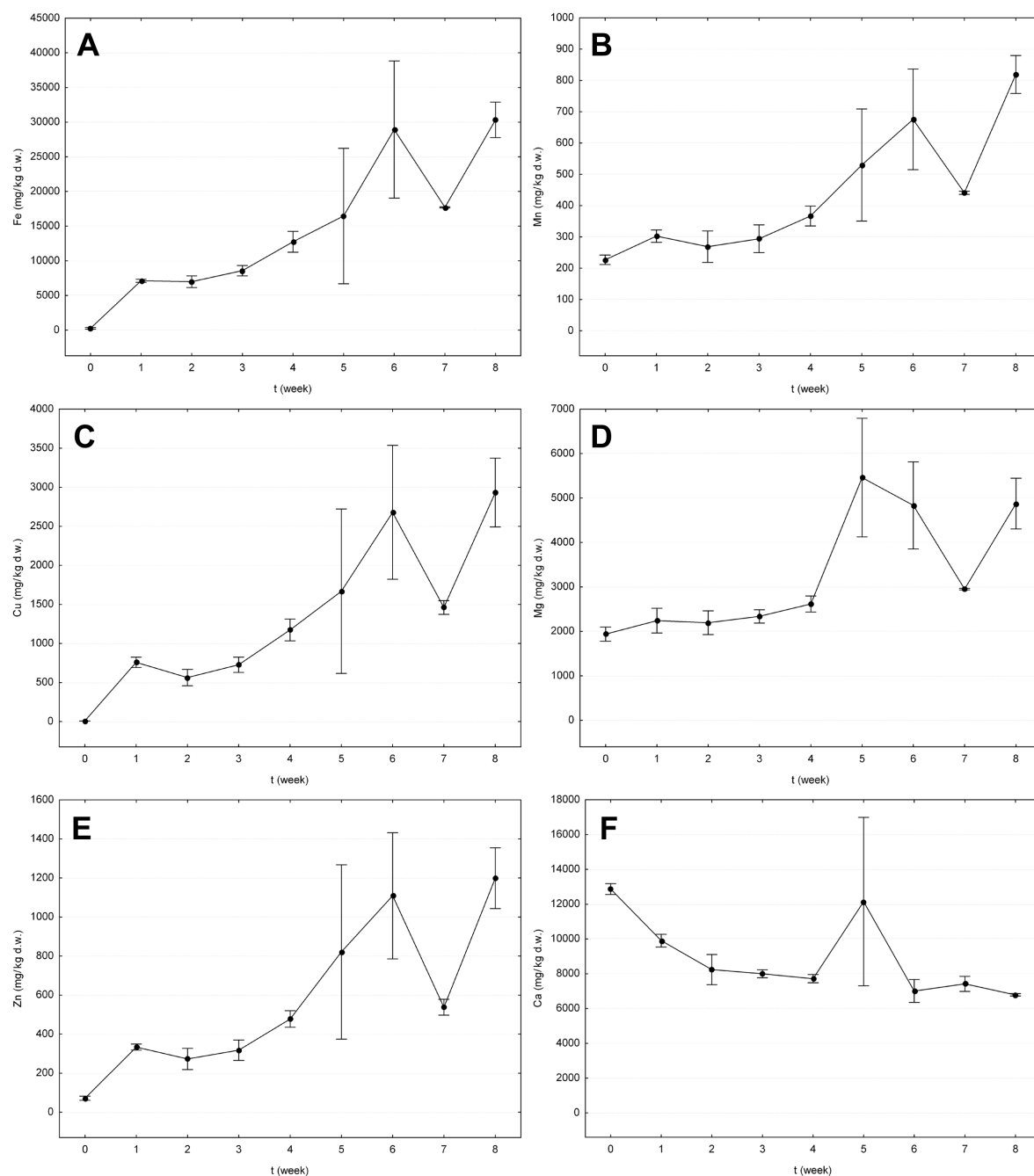


Figura 9: Representación gráfica de las concentraciones (mg/kg p.s.) medias ($n=3$) de Fe (A), Mn (B), Cu (C), Mg (D), Zn (E) y Ca (F) frente al tiempo (semanas) de los individuos de *N. oleander* procedentes de aguas menos ácidas (LEA). Los puntos indican las medias y los bigotes representan el error estándar.

En las observaciones de microscopía (Figuras 10 y 11) los mayores depósitos de Fe se localizaron en el interior de las células vasculares tanto de la raíz como del tallo, formando placas discontinuas que recubren las paredes de los conductos xilemáticos, compuestas principalmente de Fe, K, S y P. En la mayoría de los casos, los análisis EDX muestran trazas de Mn, Cu y Zn asociados a estos depósitos. Se observaron parches de la misma composición en la superficie de las raíces que pueden asociarse a la formación incipiente de una placa de hierro. Además, la aparición de depósitos de Fe en el interior de las células de la epidermis durante el proceso de formación de la placa de hierro apoya la idea de la constitución de ésta desde el interior de la raíz. La composición de estos parches y depósitos difiere de la encontrada en los individuos de las comunidades naturales estudiados en el artículo anterior, destacando la ausencia de Si y Al. Estas diferencias en la composición de la placa se deben principalmente a las diferencias en los elementos disponibles en el medio durante su producción, como indica Batty et al. (2000) para la placa de Fe en *Phragmites australis*, ya que la formación de la placa de hierro se produce a partir de la biomineralización de óxidos e hidróxidos de Fe, a cuyos grupos funcionales se unen otros cationes y aniones (Kuo, 1986; Otte et al., 1989).

Las imágenes de SEM también muestran la presencia de numerosos cristales de Mg y Ca principalmente en la médula y el cortex de los tallos, así como en los peciolos y el mesófilo de las hojas. En ambos tipos de plantas el número de drusas de Ca detectadas se redujo a lo largo del experimento en consonancia con la disminución de la concentración de Ca observada en el análisis elemental. Esto puede deberse a la reutilización del Ca biomineralizado causada por la ausencia del mismo en la disolución del tratamiento. Además, las cristalizaciones de Ca observadas en ocasiones contenían porcentajes importantes de Cu o Fe, lo que parece indicar un posible uso del Ca en la inmovilización de dichos metales. Esta función de las drusas de Ca ha sido discutida previamente en plantas vasculares (Mazen, 2004)

Los resultados expuestos no reflejan el comportamiento excluyente que esta especie presenta en su entorno natural. No obstante la hiperacumulación de Cu y Fe en las plántulas de *N. oleander* nos permite plantear la posibilidad de su uso en técnicas de fitoextracción y blastofiltración en entornos acuáticos ácidos altamente contaminados, favorecidas por su fácil germinación y rápido crecimiento.

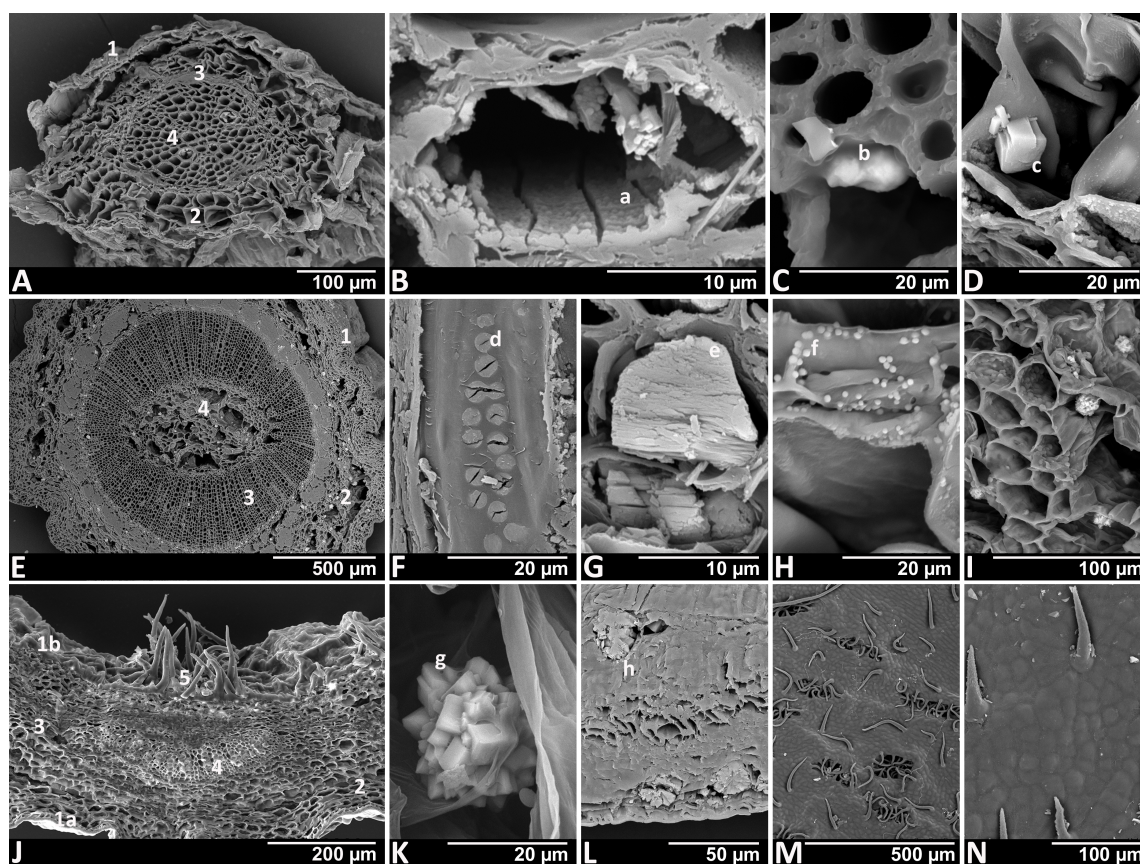


Figura 10: Imágenes SEM representativas de *Nerium oleander* de aguas extremadamente ácidas (EA). **A** Corte transversal de raíz (1 epidermis, 2 cortex, 3 endodermis, 4 cilindro central). **B** Célula vascular del cilindro central de la raíz recubierta de Fe, S, K y P. **C** Acumulación de Fe en el cortex de la raíz. **D** Cristal de Mg en el cortex de la raíz. **E** Corte transversal del tallo (1 epidermis, 2 cortex, 3 cilindro central, 4 médula). **F** Tráqueas de un conducto vascular del tallo colapsadas con depósitos de Fe. **G** Detalle de célula colapsada en el cilindro central del tallo. **H** Cristales de Ca en la epidermis del tallo. **I** Drusas de Ca en la médula del tallo. **J** Sección transversal de la hoja (1a epidermis adaxial, 1b epidermis abaxial, 2 parénquima en empalizada, 3 mesófilo, 4 tejido vascular, 5 cavidad estomática). **K – L** Detalle de drusa de Ca y su localización bajo la epidermis de la hoja. **M y N** Superficie abaxial y adaxial de la hoja. Las letras en minúscula indican la localización de los análisis EDX de la Figura 12.

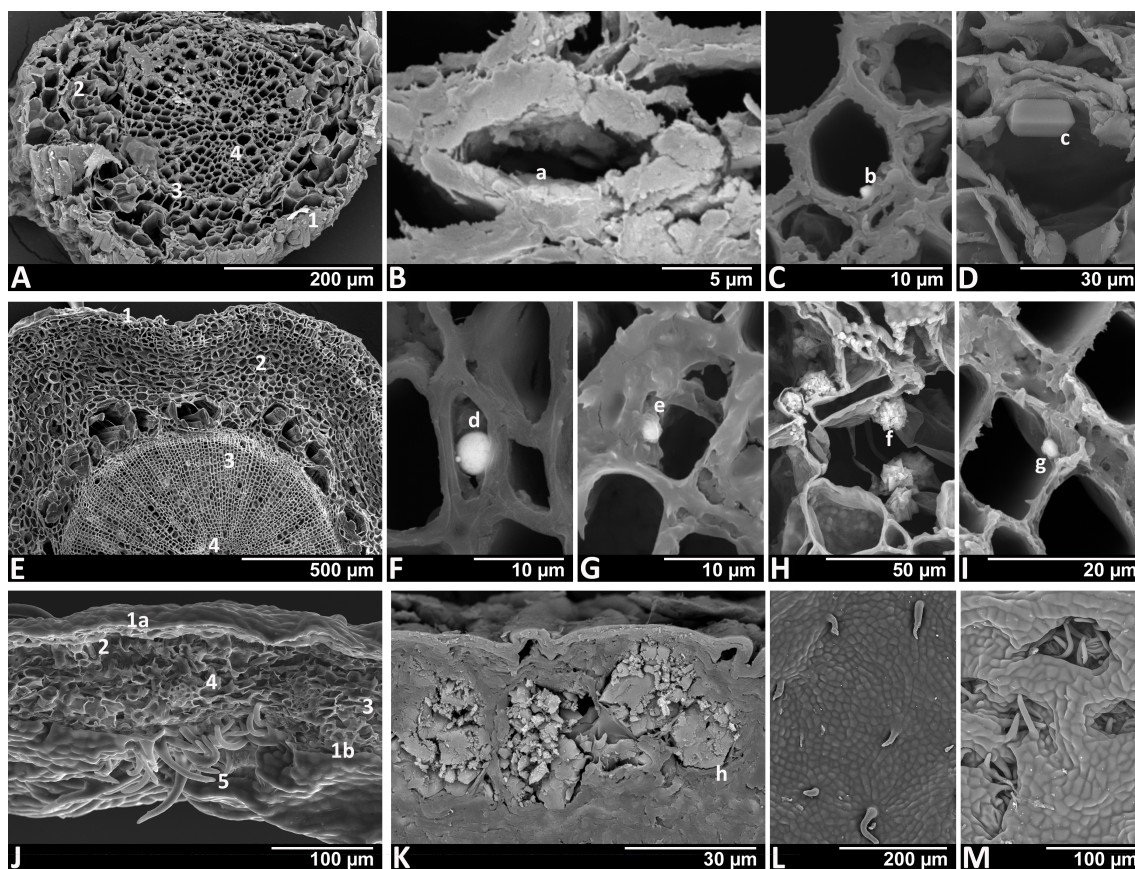


Figura 11: Imágenes SEM representativas de *Nerium oleander* de aguas menos ácidas (LEA). **A** Sección transversal de raíz (1 epidermis, 2 cortex, 3 endodermis, 4 cilindro central). **B** Célula vascular del cilindro central de la raíz recubierta de Fe, S, K, Ca y P. **C** Partícula de Fe pegada a la pared de un acélula en el cilindro central de la raíz. **D** Cristales prismáticos de Mg y K en el cortex de la raíz. **E** Sección transversal del tallo (1 epidermis, 2 cortex, 3 cilindro central, 4 médula). **F** Partícula esférica de Fe en el cilindro central del tallo. **G** Partícula de Fe en la pared de una célula del cilindro central del tallo. **H** Drusas de Ca en la médula. **I** Partícula de Si en el cilindro central. **J** Sección transversal de la hoja (1a epidermis adaxial, 1b epidermis abaxial, 2 parénquima en empalizada, 3 mesófilo, 4 tejido vascular, 5 cavidad estomática). **K** Drusas de Ca bajo la epidermis adaxial. **L** y **M** Superficies adaxial y abaxial de la hoja. Las letras en minúscula indican la localización de los análisis EDX de la Figura 13.

Figura 12: Espectros EDX de *N. oleander* de aguas extremadamente ácidas (EA) correspondientes a las letras minúsculas de la Figura 10.

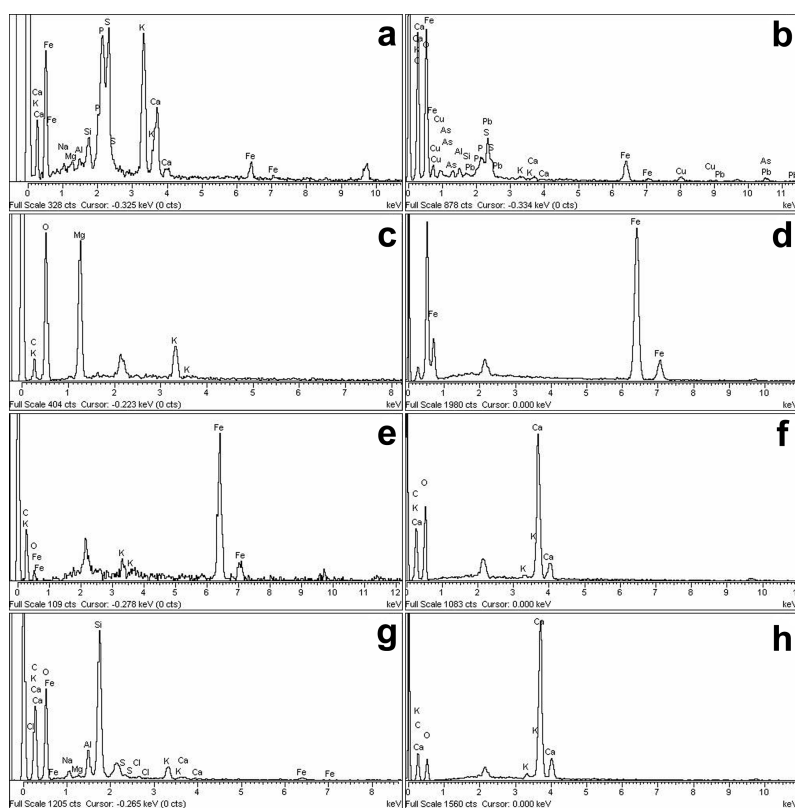
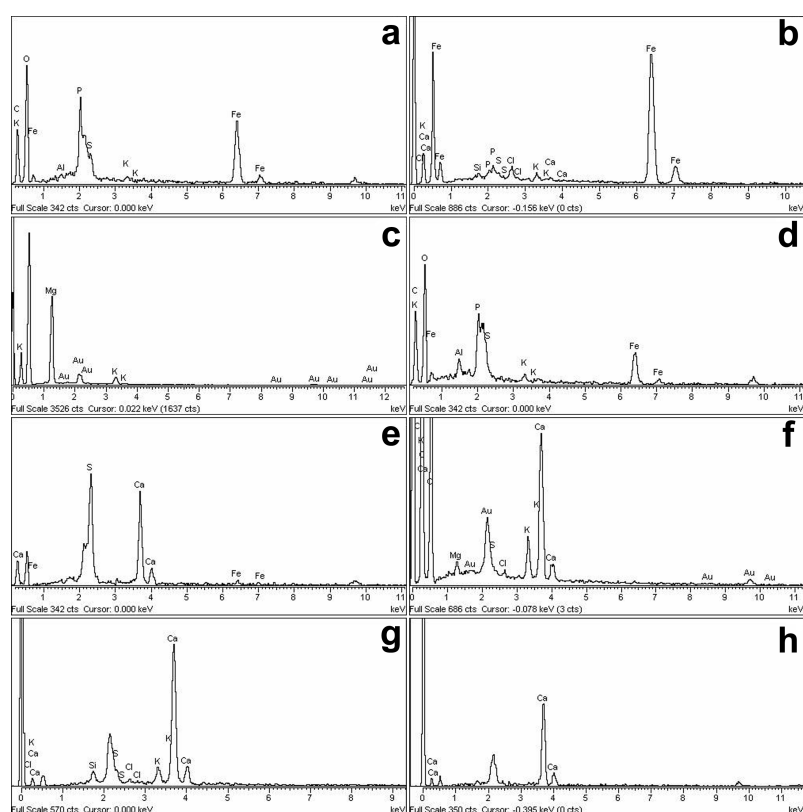


Figura 13: Espectros EDX de *N. oleander* de aguas menos ácidas (LEA) correspondientes a las letras minúsculas de la Figura 11.

II - *Cynodon dactylon*

En el tercer trabajo presentado estudiamos la relación de la absorción y distribución de Fe en los diferentes órganos y tejidos de *C. dactylon* comparando datos obtenidos en especímenes de campo con los obtenidos en individuos cultivados tras un tratamiento hidropónico bajo condiciones controladas. En la tabla 8 se muestran las concentraciones de Fe obtenidas a lo largo del experimento. En las muestras analizadas antes del tratamiento (0 días), las raíces presentan valores considerados altos para plantas vasculares, por encima de los niveles fitotóxicos (1000-3000 mg/kg de peso seco, Kabata-Pendias, 2001), mientras que las concentraciones de rizomas y hojas no sobrepasan los valores normales. A lo largo del experimento, las raíces que han crecido durante el tratamiento alcanzan el mismo rango de concentración que las demás, superando los valores fitotóxicos desde los primeros 15 días. También se produce un incremento en la concentración de Fe en hojas y rizomas durante los primeros 15 días, si bien éste es significativamente mayor en las hojas, las cuales exceden también los valores fitotóxicos. Las raíces de *C. dactylon* en su entorno natural alcanzan concentraciones de Fe muy por encima de los observados en el experimento, sin embargo, los resultados para rizomas y hojas son inferiores que los que obtuvimos al final del tratamiento.

Tabla 8: Concentración media (n=3) de Fe (mg/kg p.s.) y desviación típica (SD) de raíz, rizoma y hoja de *C. dactylon*. RT hace referencia al espécimen recolectado en su población natural. Las letras indican diferencias significativas entre los valores medios (a, b, ab). Letras iguales indican igualdad estadística entre las medias. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

		RT	0 days	15 days	30 days	45 days	60 days
Root	mean	63 972	10 456	5 920	7 677	11 543	10 712
	SD	–	10 350	1 073	1 381	4 384	3 844
Rhizome *	mean	1 603	43.1 ^a	1 391 ^{ab}	3 354 ^b	3 545 ^{ab}	2 659 ^{ab}
	SD	–	62.6	1 009	1 140	1 631	1 349
Leaf **	mean	3 111	234 ^a	9 848 ^b	8 876 ^b	7 602 ^b	9 410 ^b
	SD	–	56.3	406	2 951	3 345	–

Tabla 9: Coeficientes de Translocación entre los diferentes órganos de *C. dactylon*. RT hace referencia al individuo recolectado en su población natural.

	RT	0 days	15 days	30 days	45 days	60 days
Leaf/rhizome	1.94	5.43	7.08	2.65	2.14	3.54
Rhizome/root	0.025	0.003	0.235	0.437	0.307	0.248
Leaf/root	0.049	0.016	1.66	1.16	0.659	0.878

Los coeficientes de translocación (Tabla 9) muestran como la relación hoja/raíz antes del tratamiento es significativamente inferior a la unidad y, tras los primeros 15 días, pasa a ser significativamente superior a 1. Esto indica que al inicio del tratamiento se produce una rápida translocación de Fe desde las raíces a las hojas. Durante el resto del tratamiento, la concentración en las hojas se mantiene constante, y el Fe se acumula en las raíces, por lo que esta relación disminuye hasta situar su valor en torno a 1. La relación rizoma/raíz es siempre inferior a 1 y la relación hoja/rizoma es muy superior a 1, durante todo el experimento. En su entorno natural, el rizoma también presenta las menores concentraciones de Fe, y mantiene valores por debajo de los valores fitotóxicos pese a las elevadas concentraciones de Fe detectadas en la raíz. Este patrón de acumulación parece indicar la existencia de un mecanismo a través del cual la planta evita que la concentración de Fe en el rizoma supere significativamente los valores fitotóxicos. Este comportamiento de protección del rizoma frente a las elevadas concentraciones de metales se ha observado en otras gramíneas y plantas rizomatosas, como *Phragmites australis* (Fürtig et al., 1999) y *Cymodocea nodosa* (Llagostera et al., 2011).

En las imágenes de microscopía electrónica (figuras 14 y 15) se observan las diferentes acumulaciones de Fe encontradas en las raíces y rizomas de *C. dactylon*. La gruesa capa de Fe, K y S que encontramos en la raíz del espécimen de campo parece ser la causa de la elevada diferencia en la concentración de hierro con las raíces del experimento. En estas últimas encontramos una fina placa sobre la epidermis, y pequeñas partículas en el interior de las células epidérmicas, compuestas de Fe, K y S. Su composición similar nos indica que, con el tiempo suficiente y las condiciones apropiadas, ésta se desarrollará hasta formar una placa más densa y compacta, aumentando la concentración de Fe que la planta retiene en sus raíces, y mejorando su tolerancia a los metales, al ejercer como un filtro de iones. Además de la placa de Fe, encontramos células colapsadas y acumulaciones de Fe en diferentes tejidos parenquimáticos del cortex y cilindro central de la raíz, que están prácticamente ausentes en el rizoma. Esto concuerda con la menor concentración de Fe obtenida en los rizomas.

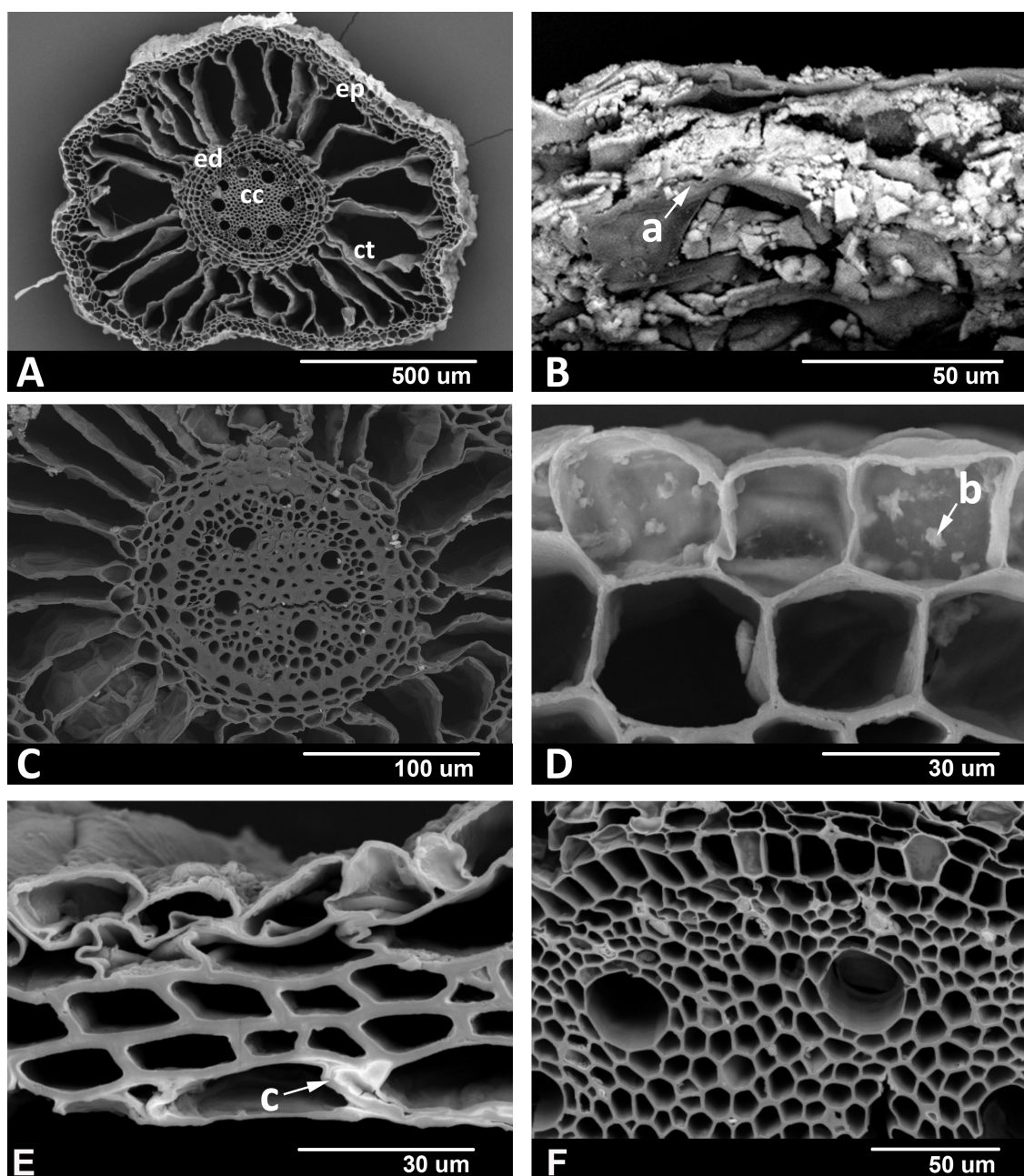


Figura 14: Fotografías SEM correspondientes a cortes de raíz de *C. dactylon*. **A:** Sección transversal de la raíz (ep: epidermis, ct: cortex, ed: endodermis, cc: cilindro central); **B:** Detalle de la placa de Fe completamente formada en la epidermis de un espécimen de campo. **C:** Cilindro central y cortex de un espécimen de campo con partículas de Fe. **D:** Partículas de Fe en las paredes celulares de la epidermis en una planta del experimento. **E:** Detalle de acumulaciones de Fe en el apoplasto. **F:** Detalle de células colapsadas en el tejido parenquimático del cilindro central. Las letras en minúscula indican la localización de los análisis EDX de la Figura 17.

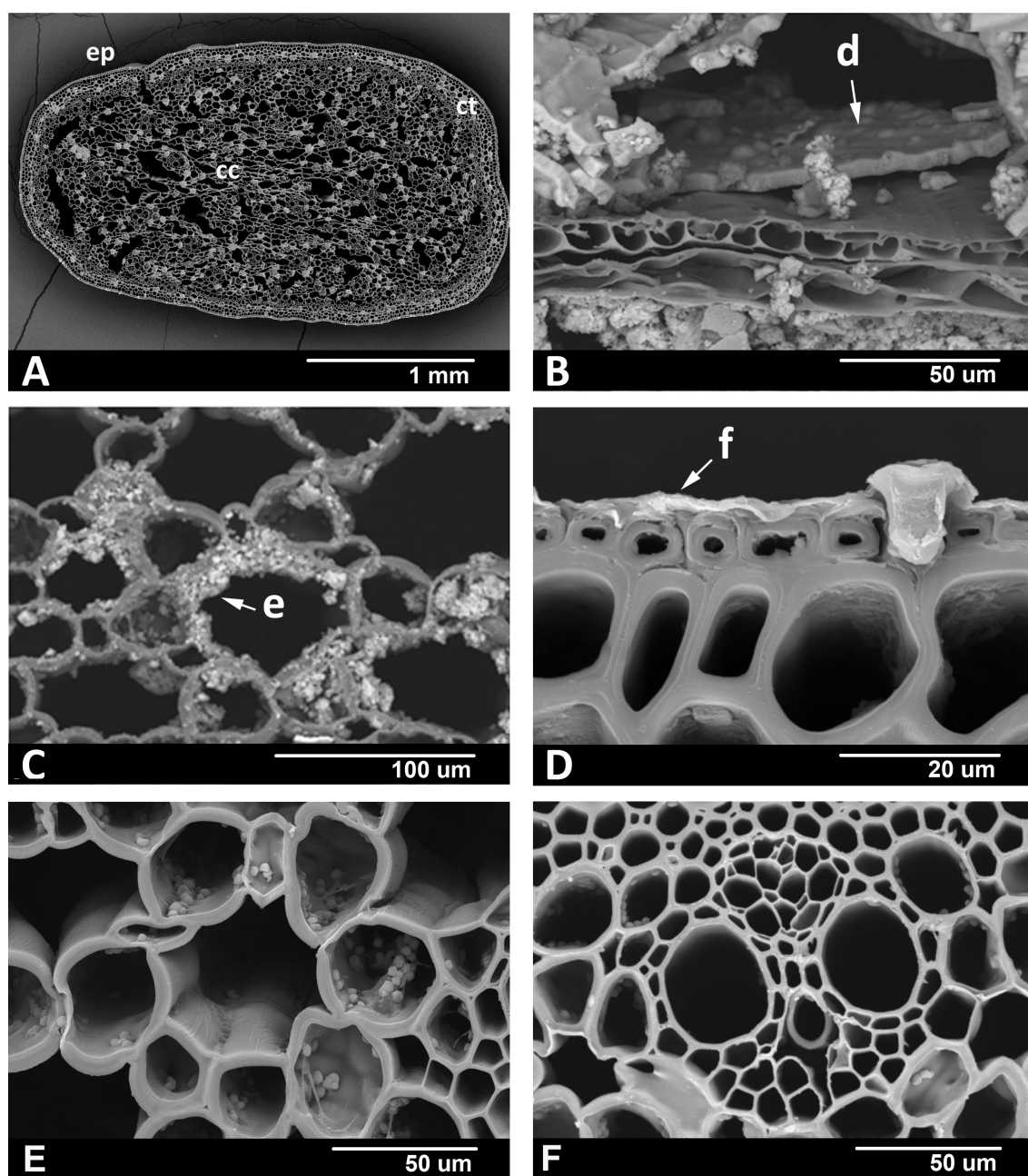


Figura 15: Imágenes SEM correspondientes a cortes de rizoma de *C. dactylon*. **A:** Sección transversal de rizoma (ep: epidermis, ct: cortex, cc: cilindro central). **B:** Placa de hierro en la epidermis del rizoma de un espécimen de campo. **C:** Depósitos de Fe en el parénquima del cilindro central de un espécimen de campo. **D:** Fina capa de Fe junto a un cuerpo de sílice en la epidermis de una planta del experimento. **E:** Partículas orgánicas en el tejido parenquimático del cilindro central. **F:** haz vascular del cilindro central. Las letras en minúscula indican la localización de los análisis EDX de la Figura 17.

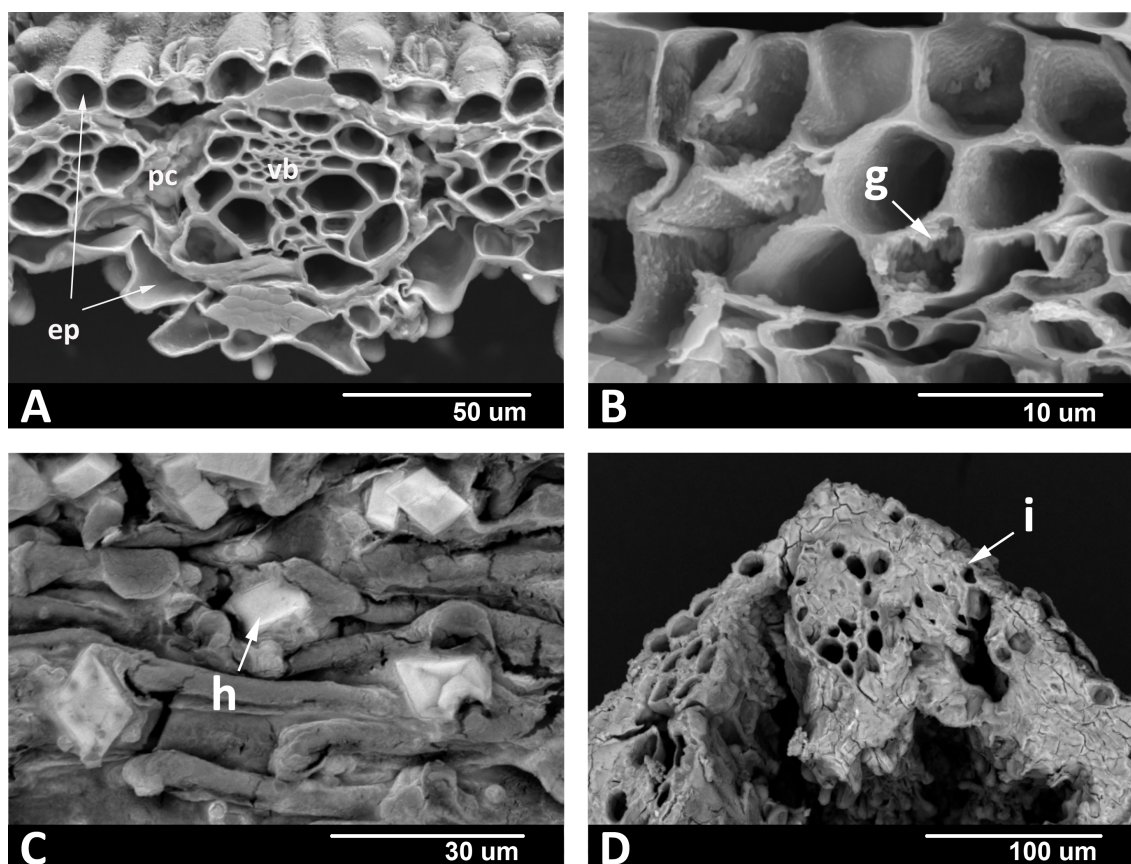


Figura 16: Fotografías SEM de cortes de hoja de *C. dactylon*. **A:** Sección transversal de hoja (ep: epidermis, pc: parénquima, vb: haz vascular). **B:** Partículas de Fe en las paredes celulares de la epidermis. **C:** Cristales prismáticos rompiendo la superficie abaxial de la hoja. **D:** Corte transversal mostrando las células colapsadas con depósitos de Fe, K, S y P. Las letras en minúscula indican la localización de los análisis EDX de la Figura 17.

En las hojas (Figura 16) se observa un incremento progresivo de acumulaciones de Fe, K y S, comenzando como pequeñas partículas en el interior de las células parenquimáticas y epidérmicas, hasta producirse, en las últimas etapas, una saturación casi completa de la hoja. En la superficie pueden observarse cristales prismáticos con la misma composición atravesando la epidermis abaxial. La gran cantidad de acumulaciones observadas en todos los tejidos de la hoja confirman la translocación del Fe a las partes aéreas, por encima de los niveles habituales para la planta, ya que en su entorno natural no se observa tal saturación de cristales y acumulaciones en las hojas.

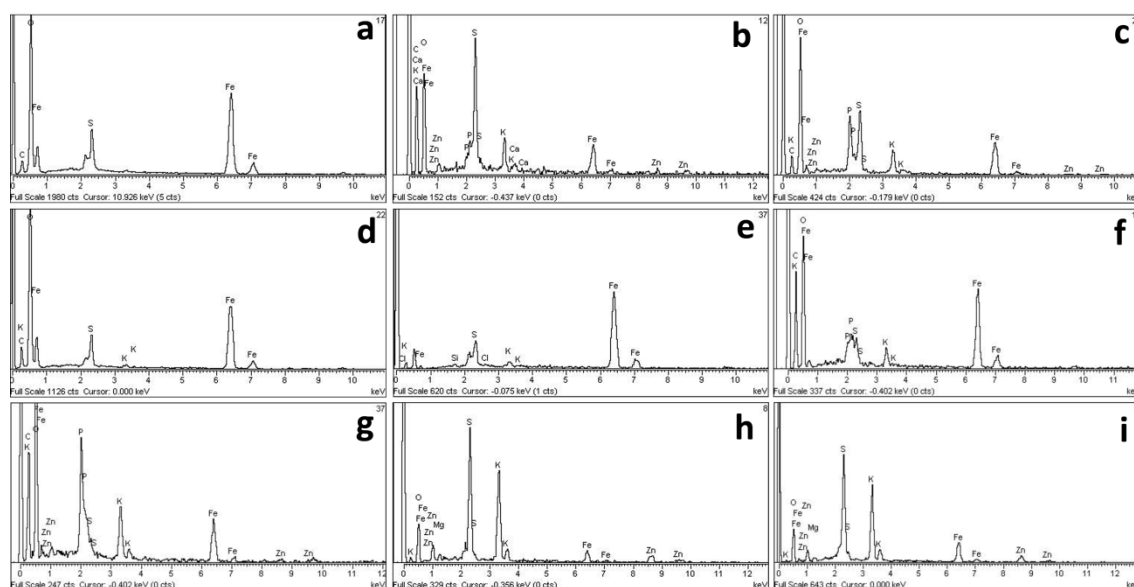


Figura 17: Espectros EDX las distintas biominingalizaciones en *C. dactylon* correspondientes a las letras minúsculas de la Figura 14 (a-c); Figura 15 (d-f); y Figura 16 (g-i).

III - *Imperata cylindrica*

El cuarto artículo presentado aborda el estudio de la concentración y la distribución y la ultraestructura del Si en los órganos de *Imperata cylindrica*. Los análisis de ICP-MS indican una elevada concentración de Si en todos los órganos de la planta (Figura 18).

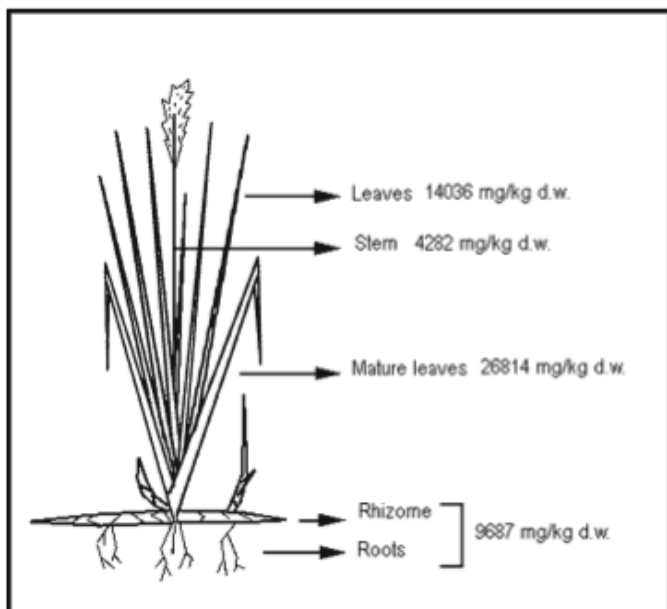


Figura 18: Esquema de *I. cylindrica* en el que se señalan las concentraciones de Si obtenidas en cada órgano mediante ICP-MS.

Estas concentraciones de Si son frecuentes en las plantas de la familia Poaceae (Hodson et al., 2005; Ma y Takahashi, 2002). Los valores obtenidos, de más del 1% en peso seco, permiten considerar a *I. cylindrica* como una planta acumuladora de silicio. Éste se encuentra distribuido de forma heterogénea en toda la planta, con una mayor concentración en las hojas más viejas. La mayor acumulación de Se en las hojas más viejas se ha observado en otras Poaceae como *Sasa veitchii* o *Brachiaria brizantha*, ésta última con fertilización de Si (Motomura et al., 2002; Melo et al., 2010). Éste hecho se ha interpretado en la literatura como una consecuencia de la absorción pasiva del Si durante los procesos de absorción de agua y la transpiración (Ma y Yamaji, 2006).

Los resultados de SEM y TEM indican que el Si aparece presente como constituyente de las paredes celulares de todos los tejidos a través de los diferentes órganos de *I. cylindrica*. No obstante, también se encontraron estructuras particulares con altas concentraciones de este elemento, como cuerpos de sílice, acumulaciones en la endodermis, y diferentes células con el lumen colapsado de silicio.

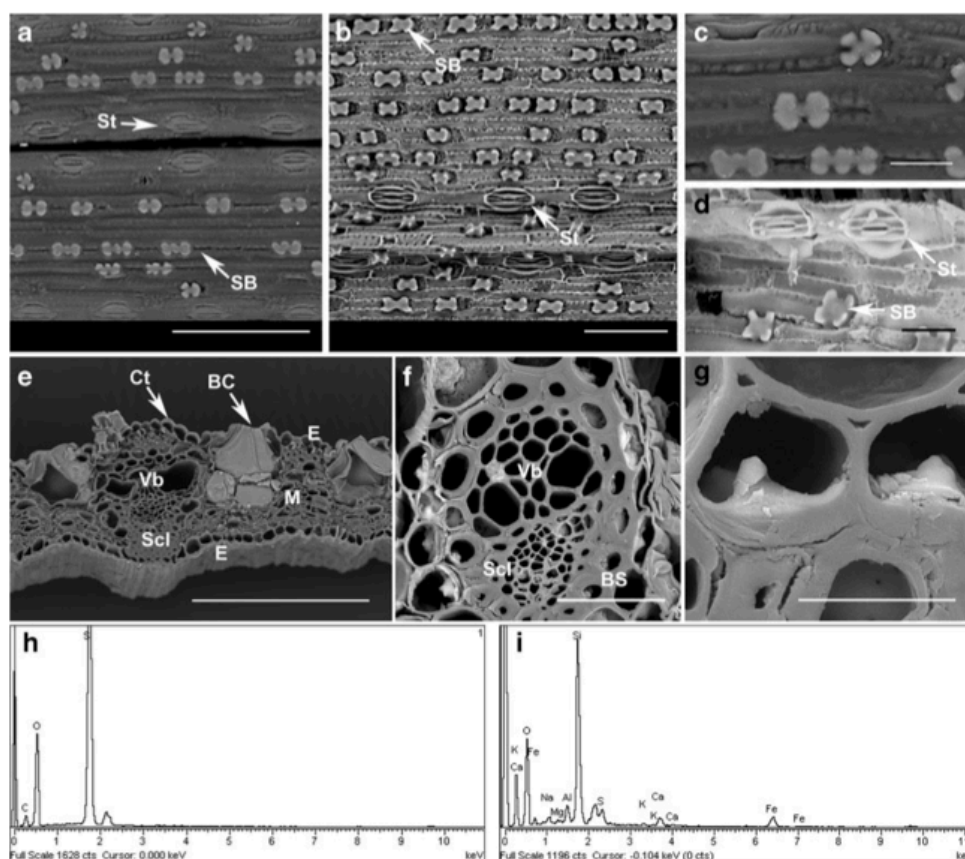


Figura 19: Imágenes SEM y espectros EDX representativos de hojas de *I. cylindrica*. El valor de la escala aparece entre paréntesis. **a** Superficie adaxial (100µm). **b** Estructura epidérmica de una hoja quemada (50µm). **c** Detalle de las distintas formas de cuerpos de sílice en la superficie de la hoja (20µm). **d** Precipitado obtenido tras la digestión ácida de cenizas de hoja (20µm). **e** Corte transversal (200µm). **f** Detalle de un haz vascular y su vaina (50µm). **g** Detalle de los depósitos de Si en las células de la vaina del haz (20µm). **h** Espectro EDX de los cuerpos de sílice de la superficie. **i** Espectro EDX de las cenizas. *BC* Celula buliforme rellena de Si, *BS* Vaina de haz vascular, *Ct* Cutícula, *E* epidermis, *M* mesófilo, *SB* Cuerpo de sílice, *Scl* Esclerénquima, *St* Estoma, *Vb* Haz vascular.

Las figuras 19, 20 y 21, muestran las mineralizaciones de Si que se han encontrado en los diferentes tejidos de hoja, rizoma y raíz respectivamente. En la epidermis de las hojas y rizomas aparecen cuerpos de sílice polilobulados-bilobulados. También se observaron depósitos de Si con forma de cuneiforme a alargada en las células buliformes de las hojas, así como conos truncados en la vaina del haz vascular y las células de la endodermis en rizomas y raíces. Por último, se observó arena de sílice en el interior del lumen de las células corticales de las raíces y células del esclerénquima alrededor del haz vascular de hojas. Todas estas estructuras se han observado previamente en otras Poaceae (Piperno y Pearsall, 1998; Ma y Yamaji, 2006; Melo et

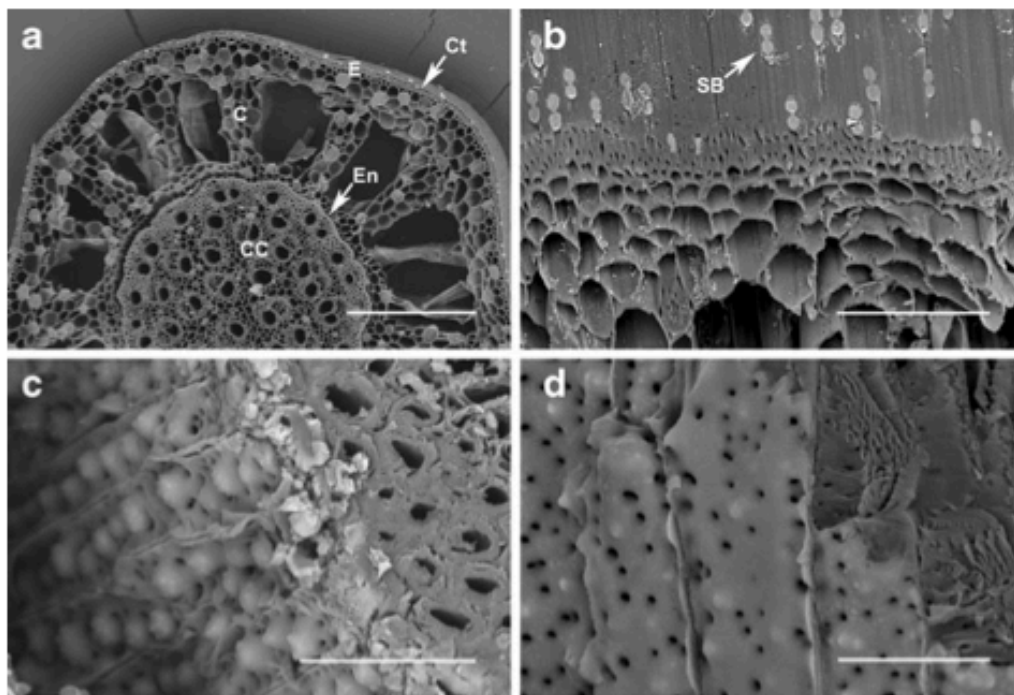


Figura 20: Imágenes SEM representativas correspondientes a rizomas de *I. cylindrica*. El valor de la escala aparece entre paréntesis. **a** Corte transversal (*Ct* cutícula, *E* epidermis, *C* cortex, *En* endodermis, *CC* cilindro central) (500µm). **b** Detalle de la epidermis con cuerpos de sílice (*SB*) (200µm). **c** Detalle de la endodermis con depósitos cónicos de silicio (transversal) (50µm). **d** Depósitos de silicio en la endodermis (longitudinal), destacando la presencia de poros y su distribución

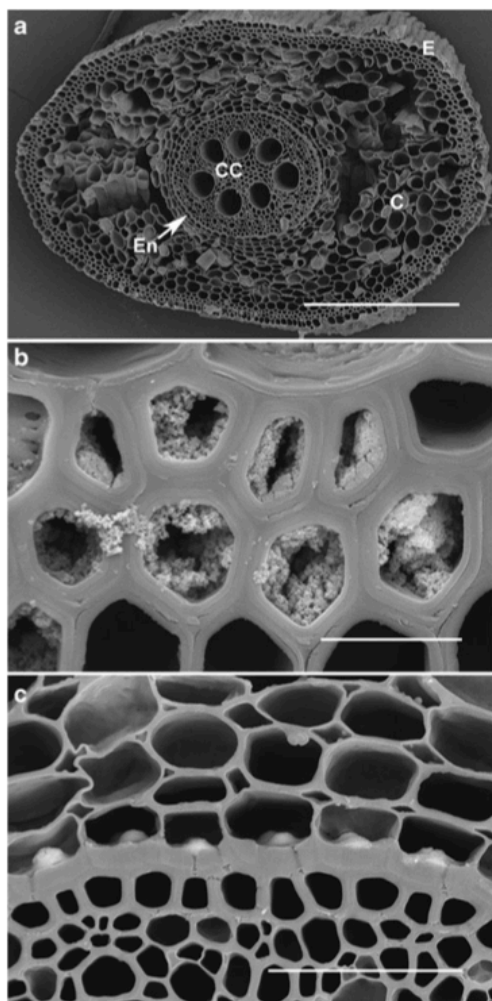


Figura 21: Imágenes SEM representativas de raíz de *I. cylindrica*. El valor de la escala aparece entre paréntesis. **a** Corte transversal (*E* epidermis, *C* cortex, *En* endodermis, *CC* cilindro central) (500µm). **b** Detalle de depósitos de Si en las fibras externas del cortex (20µm). **c** Sección transversal con detalle de la endodermis (50µm).

al., 2010) con distribución similar. También se conoce la acumulación de Si en la endodermis de *Oryza sativa*, *S. veitchii*, *Triticum aestivum* y *Sorghum bicolor*, así como la presencia de depósitos de Si de forma similar a las observadas en *I. cylindrica*, conocidos como cuerpos de Rasdorsky, en otras Andropogoneae (Borissow 1924, 1925, 1928; Hodson y Sangster 1989a, b). La banda de Caspari, en la endodermis, tiene como función regular el flujo de agua y otras sustancias actuando como una barrera al transporte apoplástico (Enstone et al., 2003; Alassimone et al., 2012). Ma et al. (2007a y b) señalan que ésta es una de las ubicaciones de las proteínas de transporte de membrana plasmática descritas como controladoras del transporte de ácido silícico en las raíces del arroz. Por tanto, los depósitos de Si que encontramos en *I. cylindrica* podrían estar relacionados con la regulación del transporte del Si hacia los tejidos vasculares. No obstante, como las funciones de estas proteínas de transporte pueden variar de una especie a otra (Mitani et al., 2009), es necesario profundizar en este aspecto en posteriores estudios.

Las observaciones de la ultraestructura de las acumulaciones de silicio realizadas en el TEM se muestran en la figura 22. Se observó una gruesa capa de silicio formada por varios fragmentos alargados estrechamente unidos a lo largo de las paredes engrosadas de las células endodermis. En las imágenes se observaron los conos truncados y los poros de la capa de sílice. A mayor resolución, se aprecia que los fragmentos de silicio están atravesados por varias hebras finas de baja densidad de electrones. Las células con relleno de silicio muestran un lumen con una densidad variable de pequeños fragmentos redondeados, dependiendo de las diferentes etapas de la deposición de silicio en el interior de las células. El análisis de difracción indicó que todas estas estructuras son materiales amorfos. Estos resultados son similares a los observados en otras gramíneas como *Dactylis glomerata*, *Triticum spelta* y *Shorgum bicolor* (Laue et al., 2007; Narayanan et al., 2004; Sangster y Parry 1976), depósitos electrodensos de Si más o menos fragmentados atravesados por finas líneas de material menos denso. Este material se puede interpretar como fibras de celulosa en la pared celular que actúan como un soporte orgánico de la matriz de Si. La desaparición de este soporte, o la misma preparación de la muestra, pueden ser las causas de la fragmentación de las estructuras de silicio (Laue et al., 2007)

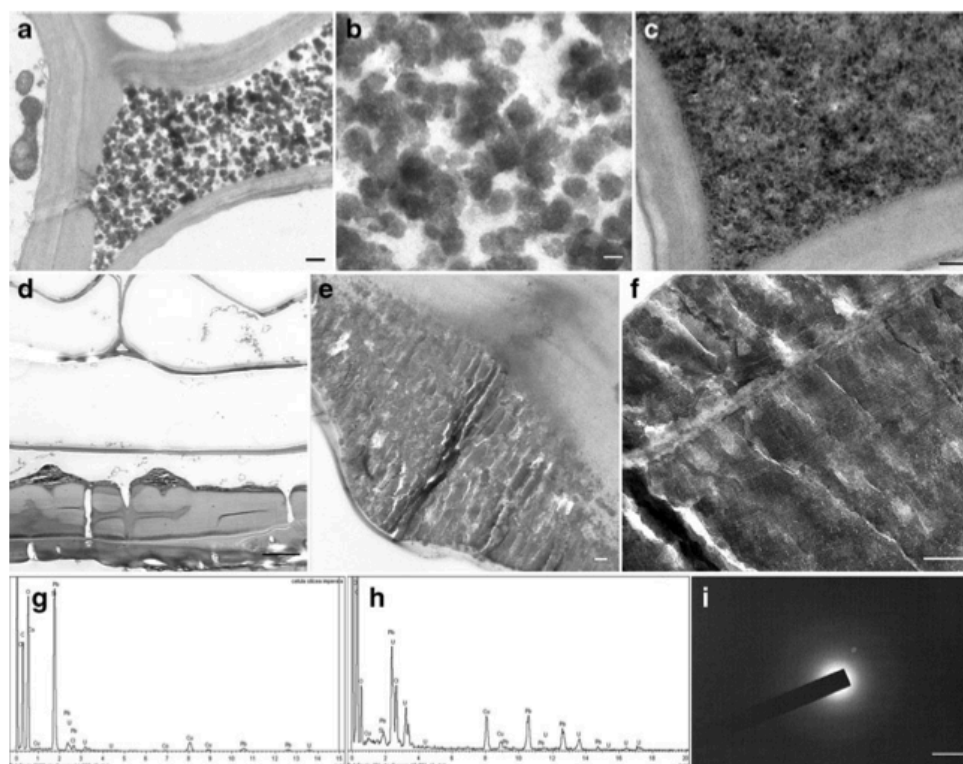


Figura 22: Imágenes TEM y espectros EDX representativos de raíz de *I. cylindrica*. El valor de la escala aparece entre paréntesis. **a** Célula cortical saturada con material de silicio granulado (500nm). **b** Detalle de la ultraestructura de los depósitos de Si dentro de las células parenquimáticas (100nm). **c** Célula cortical con un relleno denso de Si (200nm). **d** Sección transversal en detalle de la endodermis (6µm). **e, f** Detalle de la ultraestructura de los depósitos de Si de la endodermis (200nm). **g, h** Espectros EDX del interior de una célula cortical saturada (g) y de su pared celular (h). **i** Patrón de los depósitos de Si obtenidos mediante difracción de electrones de transmisión.

IV – ARTÍCULO EN PREPARACIÓN

Absorción y Distribución de Fe en *Imperata cylindrica*

(L.) P. Beauv en condiciones controladas

Introducción

Imperata cylindrica (L.) P. Beauv. es una especie perenne de tallos rizomatosos muy desarrollados y hojas de entre 40-90 cm de longitud y 2 cm de ancho que crecen generalmente agrupadas en los nodos del rizoma. El rizoma, muy ramificado y de extremo punzante, puede alcanzar una profundidad de más de 50 cm (MacDonald et al., 2006) y supone al menos el 60% de la biomasa total de la planta (Sellers et al., 2012).

Nativa del sudeste de Asia, Australia, China, Japón y Filipinas y distribuida en toda el área mediterránea. Es una planta heliófila, muy resistente tanto a sequías como a inundaciones que se encuentra en una gran variedad de suelos, de fuertemente ácidos a ligeramente alcalinos, siendo muy común en ecosistemas alterados.

En el Sur de la Península Ibérica crece en ecosistemas ribereños, cauces de pequeña entidad, bancos arenosos removidos temporalmente húmedos y ramblas, influidos por fuertes sequías en los meses de verano. En la cuenca del río Tinto la hemos observado en ecosistemas similares (Rufo y Fuente, 2011) en un entorno extremadamente ácido, con un pH cercano a 2, y con elevadas concentraciones de sulfuros de Fe y otros metales pesados, tanto en las aguas como en los suelos, procedentes de la Faja Pirítica Ibérica. En este ecosistema extremo, la dinámica del Fe es un factor determinante, con ciclos de precipitación y disolución (Amils et al., 2004) que alteran la disponibilidad biológica de este elemento, en función del pH de las aguas y suelos.

La toxicidad del Fe se ve incrementada en entornos de pH ácido en los que las concentraciones biodisponibles de este elemento son muy elevadas (Briat y Lobréaux, 1997). En estas condiciones, las plantas se ven sometidas a un fuerte estrés abiótico, generando radicales hidroxilo que pueden producir daños celulares. Sin embargo, el Fe es esencial para las plantas, desarrollando funciones específicas en la fotosíntesis, participando en la fijación de CO₂ y por tanto en la producción de biomasa. No obstante el hierro es, por norma general, un factor limitante en el crecimiento de las plantas, dada

su baja disponibilidad en ambientes oxidantes, con pH de alto a neutro. La homeostasis del hierro es por tanto un proceso muy dinámico y estrictamente regulado, encontrándose diferentes estrategias para controlar su defecto o exceso en el interior de las plantas (Palmer y Guerinot 2009; Briat et al., 2010).

Estudios previos en *I. cylindrica* mediante espectrometría de masas por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) dan valores de contenido de Fe del 1% de su peso seco (Rodríguez et al., 2005, Fuente et al., 2010). Además de Fe, también se aportan concentraciones de otros metales y metaloides como Ca, Mg, Na, Mn, Ni, Cu, Zn, As, y Pb.

Rodríguez et al. (2005), mediante espectrometría Mössbauer y difracción de rayos X, detectaron jarosita y ferrhidrita, en una proporción del 50% respectivamente, en el interior de raíces, rizomas y hojas de la planta. Estos biominerales han sido observados a nivel celular en epidermis, parénquima y en los haces vasculares. Amils et al. (2007) y Fuente et al. (2012) interpretan estas partículas como producto de la degradación del metabolismo de la proteína ferritina, que en su núcleo almacena ferrhidrita, hematita y magnetita (Theil, 1987; Wade et al., 1993; Cowley et al., 2000; Gálvez et al., 2008). Una localización más detallada de la distribución subcelular de ferritina mediante técnicas inmunocitoquímicas ha sido descrita por Fuente et al. (2012).

En este trabajo nos centramos en el estudio de la capacidad de absorción de Fe de *I. cylindrica*, para intentar reproducir su comportamiento hiperacumulador bajo condiciones controladas en el laboratorio, localizar los lugares de preferencia de acumulación, e identificar las diferentes estructuras que forma el Fe en los órganos de la planta.

Materiales y Métodos

Material vegetal:

Se recogieron ejemplares completos de *I. cylindrica* directamente de las comunidades de ribera del río Tinto, en las inmediaciones de las localidades de La Palma del Condado y Niebla (Huelva, España), seleccionando aquellos mejor conservados y de tamaños similares. Se separaron secciones de los rizomas y, tras una limpieza con agua destilada, se plantaron en macetas con sustrato universal para ser cultivados en el invernadero.

Tras un periodo de crecimiento de 12 meses, las plantas resultantes se extrajeron, se limpiaron exhaustivamente de todo residuo y se transfirieron a un sistema hidropónico puro en disolución Hoagland (pH 5,1). A esta disolución se añadieron 300 mg kg⁻¹ de Fe en forma de Fe₂SO₄·7H₂O. Para evitar la precipitación del Fe se ajustó el pH de la disolución a 3 usando H₂SO₄ [1M]. El sistema se mantuvo en el invernadero, con iluminación natural y temperatura controlada de 30°C.

La recolección de muestras se realizó cada 15 días (15, 30, 45 y 60 días) durante dos meses, tomando un muestreo previo al tratamiento (0 días). En cada toma de muestras se recogieron tres plantas enteras y se separaron en raíz, rizoma y hojas, que también fueron lavadas y congeladas hasta el momento de los análisis.

Análisis químico elemental:

Para el análisis elemental de la concentración de Fe, se estudiaron por separado raíz, rizoma y hoja, previamente lavadas, y secadas en una estufa a 75 °C durante 24h. Una muestra homogeneizada de aproximadamente 500 mg de cada parte a analizar se colocó en un tubo de Teflón para su digestión ácida en una mezcla de 8 mL de HNO₃ al 65% y 2 mL de H₂O₂ al 30% dentro de un digestor de microondas MLS Ethos 1600 URM Milestone de alta presión, siguiendo el protocolo descrito por Zuluaga et al. (2011) para una máxima recuperación elemental en material vegetal. Posteriormente se ajustó el volumen de cada muestra a 25mL con agua desionizada y las alícuotas resultantes se analizaron mediante un instrumento ICP ELAN-6000 PE Sciex (Toronto, Ontario, Canadá). Se obtuvieron así concentraciones de Fe en mg/kg de peso seco.

Análisis de microscopía:

- SEM (EDX)

Los especímenes de *I. cylindrica* (tres por cada toma de muestras) se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido, complementada con análisis de energía dispersiva de rayos-X siguiendo el protocolo habitual en el estudio de metales en material vegetal (Berazaín et al., 2007a y b; Rodríguez et al., 2007; Amils et al., 2007; Fuente et al., 2012).

Los órganos y tejidos estudiados fueron: raíz (epidermis; cortex; endodermis; cilindro central), rizoma (epidermis; cortex; endodermis; cilindro central) y hoja (epidermis adaxial y abaxial; parénquimas del mesófilo; células buliformes; haces vasculares). Tanto superficies como cortes longitudinales y transversales de los mismos se colocaron sobre portas de grafito conductivo y se metalizaron con una capa de oro de 10nm de espesor en un metalizador BIO-RAD SC 502. Las muestras se examinaron con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N (Japón), empleando un voltaje de aceleración de 20 kV y una distancia de trabajo de 15 mm. . Durante los análisis la temperatura de las muestras era equivalente a la temperatura de la habitación.

- TEM (EDX)

Pequeñas secciones de raíz y rizoma de *I. cylindrica* (1mm³) se prepararon siguiendo el protocolo empleado en Rufo et al. (2013). Este protocolo es el estándar en preparación y observación de material vegetal. Las muestras se examinaron a 80Kv en un microscopio electrónico Jeol JEM-1010 (Tokyo, Japon) (Centro de Biología Molecular, CSIC, Madrid) y a 200Kv en un microscopio electrónico JEM 2000FX (Tokyo, Japan) (Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Madrid) equipado con un microanalizador de Energía Dispersiva de Rayos-X LINK ISIS 300 (Oxford, Inglaterra).

Estudio de la mineralogía:

-Difracción de rayos-X:

Las muestras de *I. cylindrica*, secas y molidas previamente, se emplearon para obtener un patrón de difracción de rayos-X empleando un equipo Siemens-D5000 (Siemes AG, Karlsruhe, Alemania), con radiación de Cu K α (8.04 keV) y un detector de Si-Li proporcionado por Kevex (Valencia, CA, USA) enfriado por efecto Peltier, permitiendo una resolución de 240 eV (Bermúdez *et al.*, 1999).

Análisis estadísticos:

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc., Tulsa, USA). Se calcularon medias, medianas, desviaciones típicas y errores típicos. Los datos fueron transformados logarítmicamente tras comprobar su normalidad con el test Shapiro-Wilk ($p > 0,05$). Los coeficientes de translocación (CT) se calcularon entre los diferentes órganos de la siguiente manera:

$$CT_{H/Rz} = [M]_{hoja} / [M]_{rizoma},$$

$$CT_{Rz/R} = [M]_{rizoma} / [M]_{raíz},$$

$$CT_{H/R} = [M]_{hoja} / [M]_{raíz}.$$

Resultados**Análisis químico elemental (ICP-MS):***Hoja:*

La concentración media de Fe obtenida en las hojas en el día 0 fue de 304,1 mg/kg de peso seco. Durante el experimento, la concentración aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) hasta alcanzar los 4805 mg/kg de peso seco al final del experimento (tabla 10).

Rizoma:

Al inicio del experimento (día 0) el rizoma presentaba una concentración media de Fe de 172,1 mg/kg de peso seco. Esta concentración aumentó, durante los primeros 15 días de tratamiento, hasta los 2081 mg/kg de peso seco. No se observaron incrementos significativos durante los siguientes 30 días. Después de este periodo, la concentración aumentó, desde el día 45 hasta el 60, alcanzando 7976 mg/kg de peso seco.

Raíz:

La concentración media inicial de las raíces de *I. cylindrica* fue de 193.3 mg/kg de peso seco antes del experimento. La concentración de Fe alcanza los 8524 mg/kg de peso seco en los primeros 15 días, y continúa incrementando, de manera significativa, hasta los 53886 mg/kg de peso seco en el último día del experimento.

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

Tabla 10: Medias (M) y desviaciones típicas (SD) de los valores de concentración (mg/kg p.s.) de hoja, rizoma y raíz de *Imperata cylindrica*. En el superíndice, las letras indican diferencias entre días, y los números diferencias entre las partes de la planta. ($p < 0,05$), $n = 3$ para cada órgano.

		0 días	15 días	30 días	45 días	60 días
Hoja	M	304,1 ^{a/1}	1225 ^{b/1}	2580 ^{bc/1}	2902 ^{bc/1}	4805 ^{c/1}
	SD	171,1	260,1	551,7	1272	1518
Rizoma	M	172,1 ^{a/1}	2081 ^{b/1}	1862 ^{b/1}	2449 ^{b/1}	7976 ^{c/1}
	SD	58,83	1126	144,1	427,9	822,6
Raíz	M	193,3 ^{a/1}	8524 ^{b/2}	14.760 ^{bc/2}	21.976 ^{c/2}	53.886 ^{d/2}
	SD	87,52	2028	2183	6615	12.895

Las concentraciones de Fe previas al experimento (día 0) no son significativamente diferentes entre los diferentes órganos (hoja, rizoma y raíz). Los coeficientes de translocación (tabla 11) al final del tratamiento indican una distribución de concentración de Fe siguiendo el orden raíz > rizoma > hoja, si bien no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la concentración de hoja y rizoma en ninguna de las medidas.

Tabla 11: Coeficientes de Translocación entre los diferentes órganos de *I. cylindrica*.

	0 Días	15 Días	30 Días	45 Días	60 Días
Hoja/Rizoma	1,77	0,589	1,39	1,19	0,603
Rizoma/Raíz	0,890	0,244	0,126	0,111	0,148
Hoja/Raíz	1,57	0,144	0,175	0,132	0,089

Microscopía Electrónica de Barrido (SEM):

Las imágenes representativas de microscopía muestran una integridad estructural en todos los órganos observados a lo largo del tratamiento, donde ha sido observado el buen estado de conservación de los distintos tejidos de raíz, rizoma y hoja (Figuras 23-25).

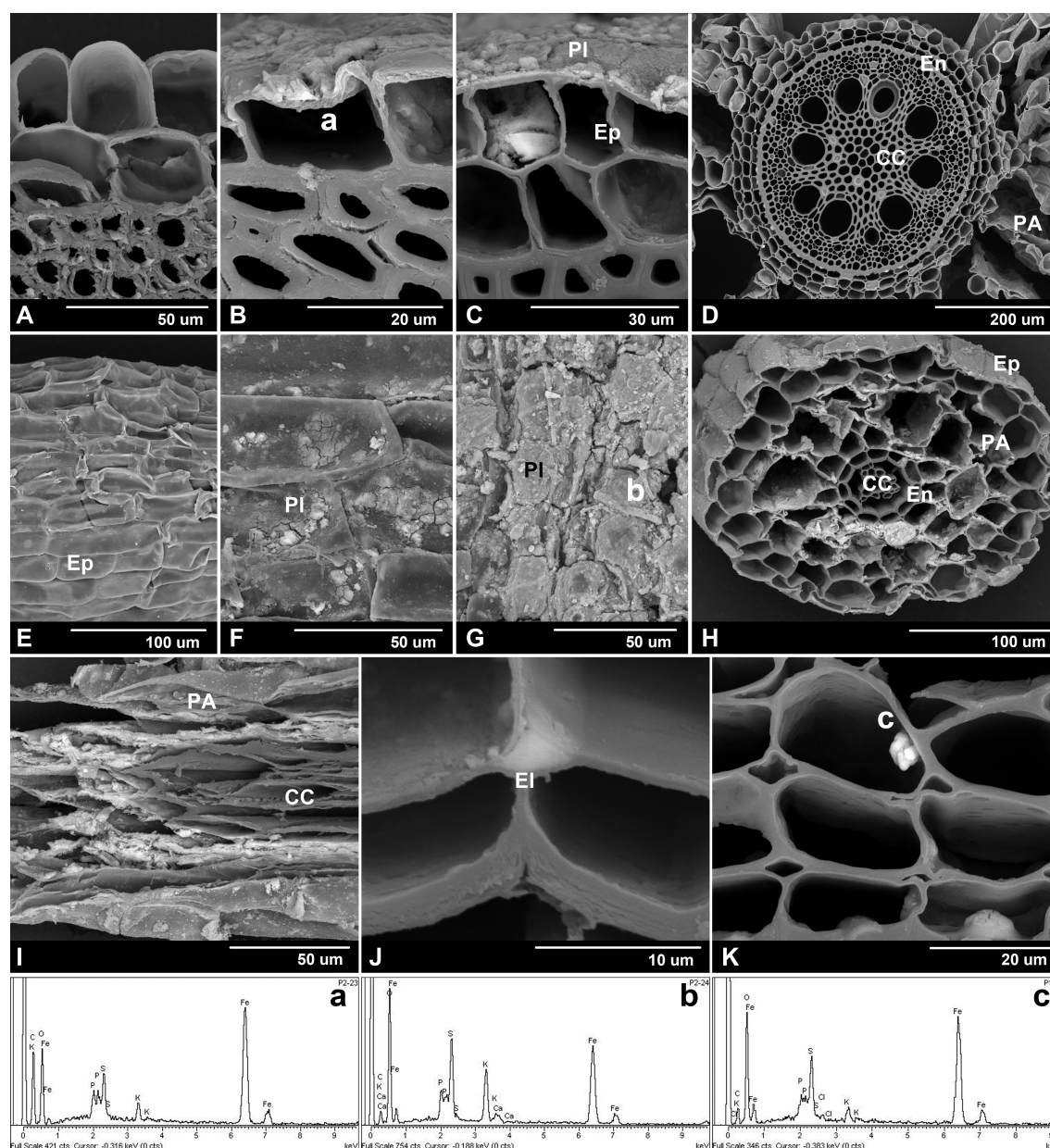


Figura 23: Imágenes SEM representativas de raíz de *I. cylindrica*. (Ep=epidermis; PI=placa de hierro; En=endodermis; PA=parénquima aerífero; CC=cilindro central; EI=espacio intercelular). **A-C** Progresión de la acumulación de Fe en secciones transversales de la epidermis (0 – 30 – 60 días). **D** Sección transversal del cilindro central. **E-G** Progresión de la formación de la placa de Fe en la superficie de la epidermis (0 – 30 – 60 días). **H** Sección transversal de raíz joven con células del córtex colapsadas. **I** Sección longitudinal de raíz joven con acumulaciones de Fe en el córtex. **J** Acumulación de Fe en espacio intercelular del córtex. **K** Partícula de Fe en el córtex. Los espectros EDX corresponden a los puntos a, b y c de las figuras B, G y K respectivamente.

Raíz:

A medida que transcurre el tiempo de crecimiento de las plantas se observa la formación de una deposición mineral en las células epidérmicas de la raíz. Dichas células carecen de depósitos (Figura 23 A y E) y según pasa el tiempo aparece una placa que llega a recubrir casi la totalidad de dichas células (Figura 23 F y G). La formación de la placa se produce tanto en el exterior en contacto con la solución a la que ha sido sometida, como en el interior, donde se observan células colapsadas (Figura 23 B y C). La composición obtenida en los análisis EDX tanto en el exterior como en el interior celular indica una composición de Fe, S y K, apareciendo en ocasiones trazas de otros elementos como Ca, Si y P.

En las células parenquimáticas (Figura 23 H e I), también se puede observar una evolución temporal respecto a las acumulaciones minerales, presentando al final del experimento células colapsadas por depósitos de Fe. Dichas acumulaciones se han observado generalmente en las paredes y espacios intercelulares (Figura 23 H, I y J). Hacia el final del experimento, las células de las raíces más jóvenes presentan una mayor densidad de estos depósitos en comparación con las células de las raíces que iniciaron su desarrollo en etapas más tempranas del tratamiento. Por norma general estas acumulaciones son amorfas, si bien en ocasiones se observan partículas aisladas con una estructura más definida (Figura 23 K).

En las células de la banda endodérmica que separa el córtex del cilindro vascular, no se han apreciado acumulaciones de hierro (Figura 23 D, H, J y K). El cilindro central y los tejidos vasculares aparecen prácticamente libres de acumulaciones de Fe, si bien a medida que avanza el experimento, el número de estas partículas aumenta, mayoritariamente en el xilema (Figura 23 D, H e I).

Rizoma:

En la figura 24 se muestran una serie de imágenes representativas del rizoma. En ellas se puede observar los diferentes tejidos: epidermis, parénquimas y cilindro central con los tejidos vasculares (Figura 24 A). Se han encontrado acumulaciones de Fe tanto en los tejidos vasculares del xilema (Figura 24 B), como en las células parenquimáticas corticales (Figura 24 C). Además de acumulaciones amorfas, en el rizoma se observan estructuras lenticulares, individuales o agrupadas (Figura 24 E y F), así como

estructuras prismáticas mejor definidas (Figura 24 G). En las células epidérmicas se observa una acumulación de partículas de Fe formando una placa discontinua sobre su superficie externa, así como la aparición de células epidérmicas colapsadas (Figura 24 H e I). Los espectros EDX indican que la composición principal estas acumulaciones corresponde nuevamente a Fe, S y K.

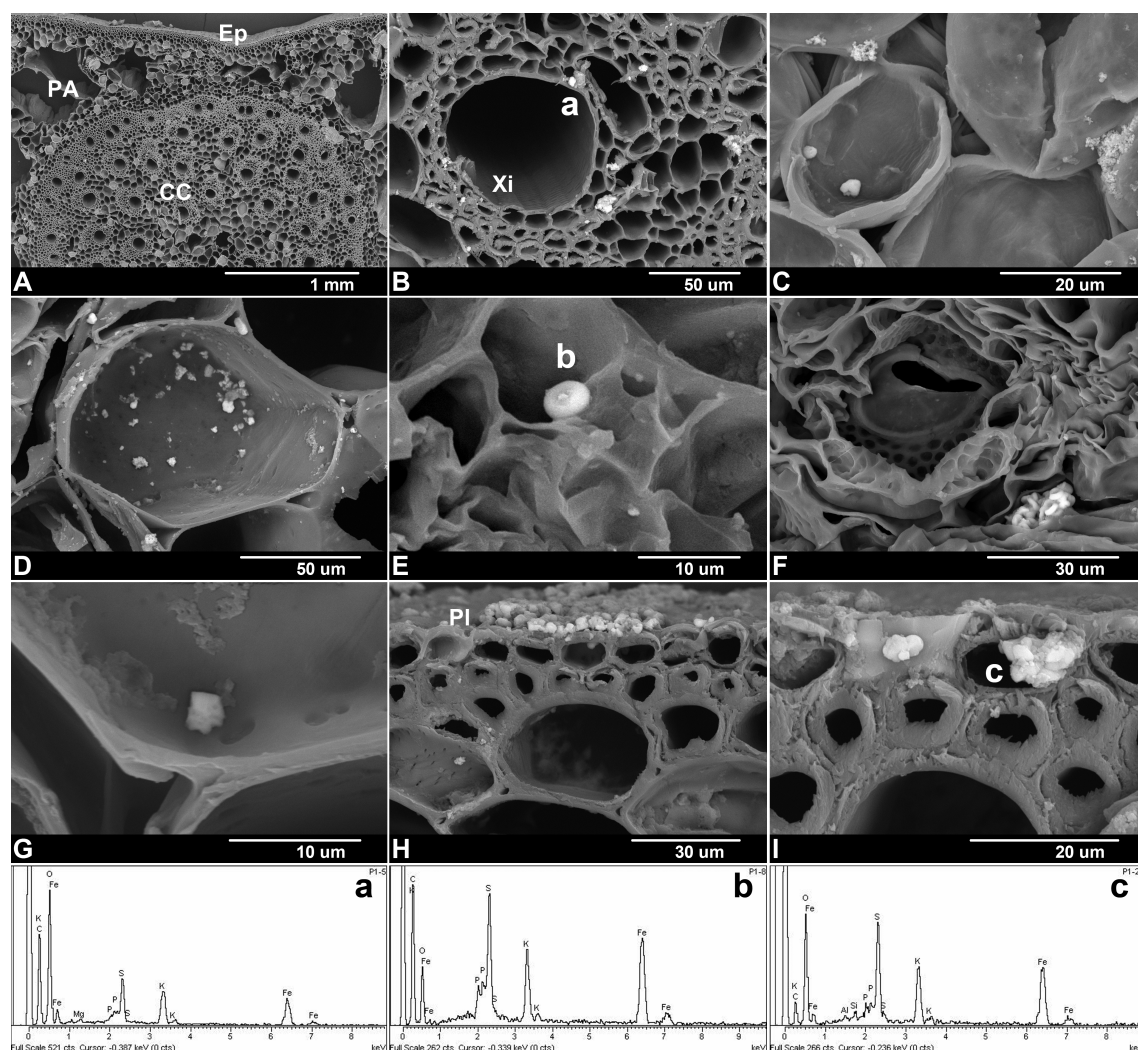


Figura 24: Imágenes SEM representativas de rizoma de *I. cylindrica*. (Ep=epidermis; PA=parénquima aerífero; CC=cilindro central; Xi=xilema; Pl=placa de hierro). **A** Sección transversal de rizoma. **B** Detalle de haz vascular en el cilindro central con partículas de Fe. **C** y **D** Detalle de células de tejido parenquimático del córtex con minerales de Fe. **E** Biomineralización lenticular de Fe en el haz vascular. **F** Agrupación de partículas lenticulares de Fe. **G** Mineral prismático de Fe en tejido parenquimático. **H** Placa de Fe sobre la epidermis. **I** Célula de epidermis saturada de Fe junto a cuerpo de sílice. Los espectros EDX corresponden a los puntos a, b y c de las figuras B, E e I respectivamente.

Hoja:

Las observaciones de los cortes de hojas (Figura 25) también muestran la presencia de partículas de Fe, principalmente en los tejidos parenquimáticos del mesófilo alrededor de los haces vasculares, y en las células de la epidermis, tanto abaxial como adaxial. Aparecen en menor número que en las raíces y rizomas estudiados, y presentan, por lo general, formas lenticulares agrupadas y partículas con estructuras mejor definidas (Figura 25 D). Aumentan en los últimos días del tratamiento. La composición de estas partículas es de Fe, S y K, apareciendo en ocasiones P, Si, Ca y Mg, según los espectros EDX.

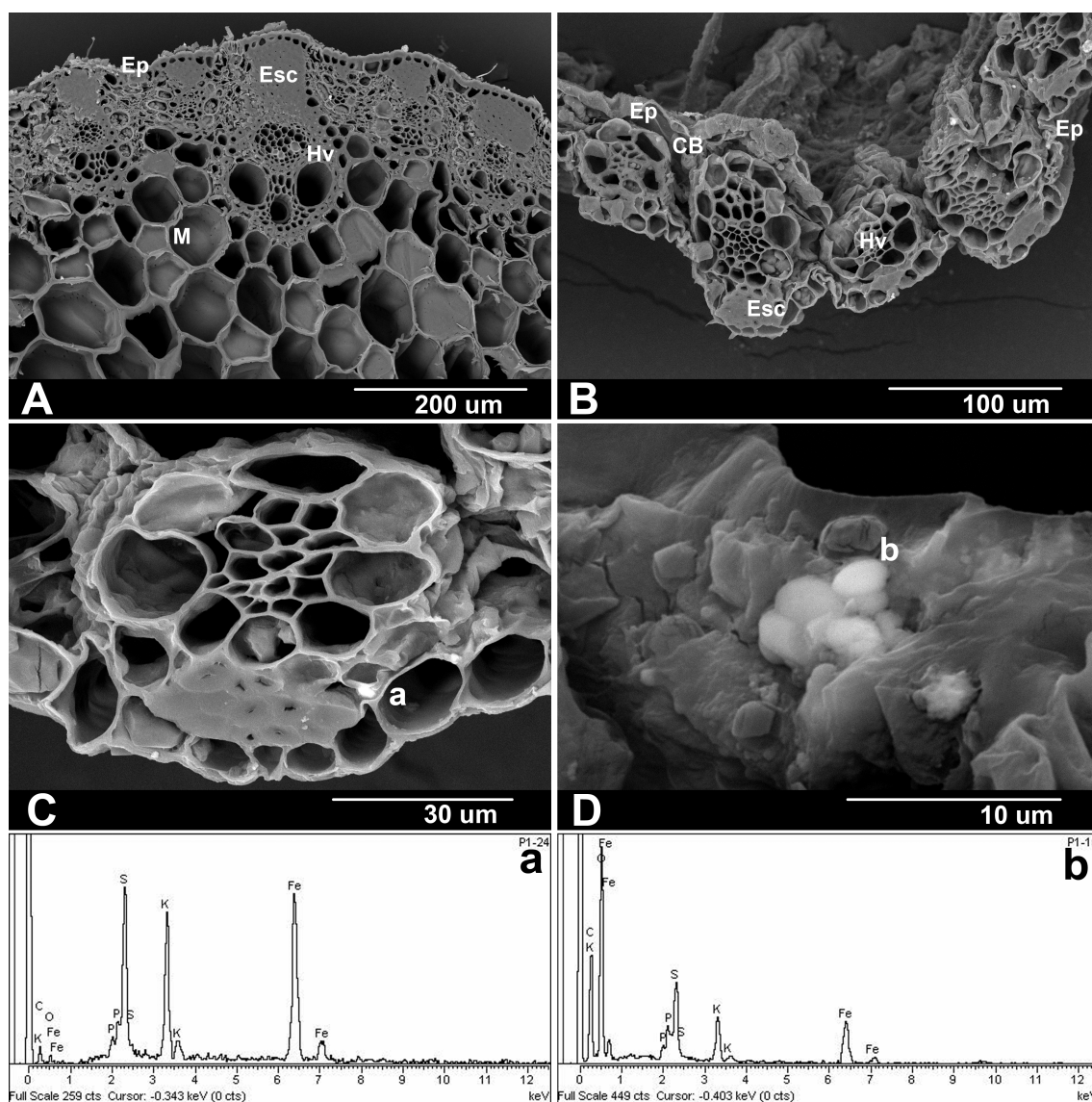


Figura 25: Imágenes SEM representativas de hoja de *I. cylindrica*. (Ep=epidermis; Esc=esclerénquima; Hv=Haz vascular; M=mesófilo; CB=célula bulifrome). **A:** Sección transversal de la hoja mostrando parte del nervio central. **B:** Sección transversal de la hoja con partículas de Fe. **C:** Detalle de haz vascular con partículas de Fe. **D:** Detalle de partículas lenticulares de Fe junto al haz vascular. Los espectros EDX corresponden a los puntos a y b de las figuras C y D respectivamente.

La figura 26 representa la media ($n=3$) de los valores de porcentaje en peso de Fe obtenidos de los espectros EDX sobre las distintas acumulaciones que encontramos en los tejidos de cada órgano, separados en epidermis, cortex y cilindro vascular. En las raíces adultas, el porcentaje de hierro es significativamente mayor ($p<0,05$) en las partículas encontradas en las células epidérmicas, mientras que en las raíces jóvenes, que se desarrollan durante las últimas fases del experimento, el porcentaje de Fe es significativamente mayor en las partículas encontradas en las células de los parénquimas corticales. Las partículas que encontramos en los rizomas y hojas tienen un porcentaje similar en todos los tejidos analizados.

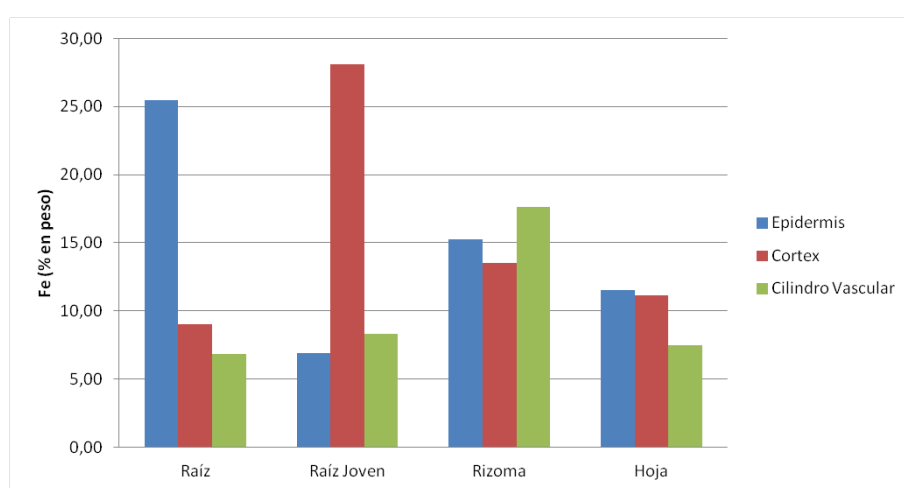


Figura 26: Media del porcentaje en peso de Fe obtenido en los análisis EDX de las diferentes acumulaciones encontradas en los tejidos de raíz y raíz joven, rizoma, y hoja de *I. cylindrica* mediante SEM.

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM):

Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 27) confirman las imágenes obtenidas por SEM en lo referente a la placa externa depositada sobre las epidermis (Figura 27 A). Las células de los parénquimas corticales (Fig 27 B), que se encuentra entre la epidermis y la barrera constituida por la endodermis, presentan células con escasos orgánulos (plastos, vacuolas, núcleo, mitocondrias, etc...) (Figura 27 A, B, C). En las imágenes se observa la pared celular engrosada de las células endodérmicas (Figura 27 B), separando claramente el cortex del cilindro vascular

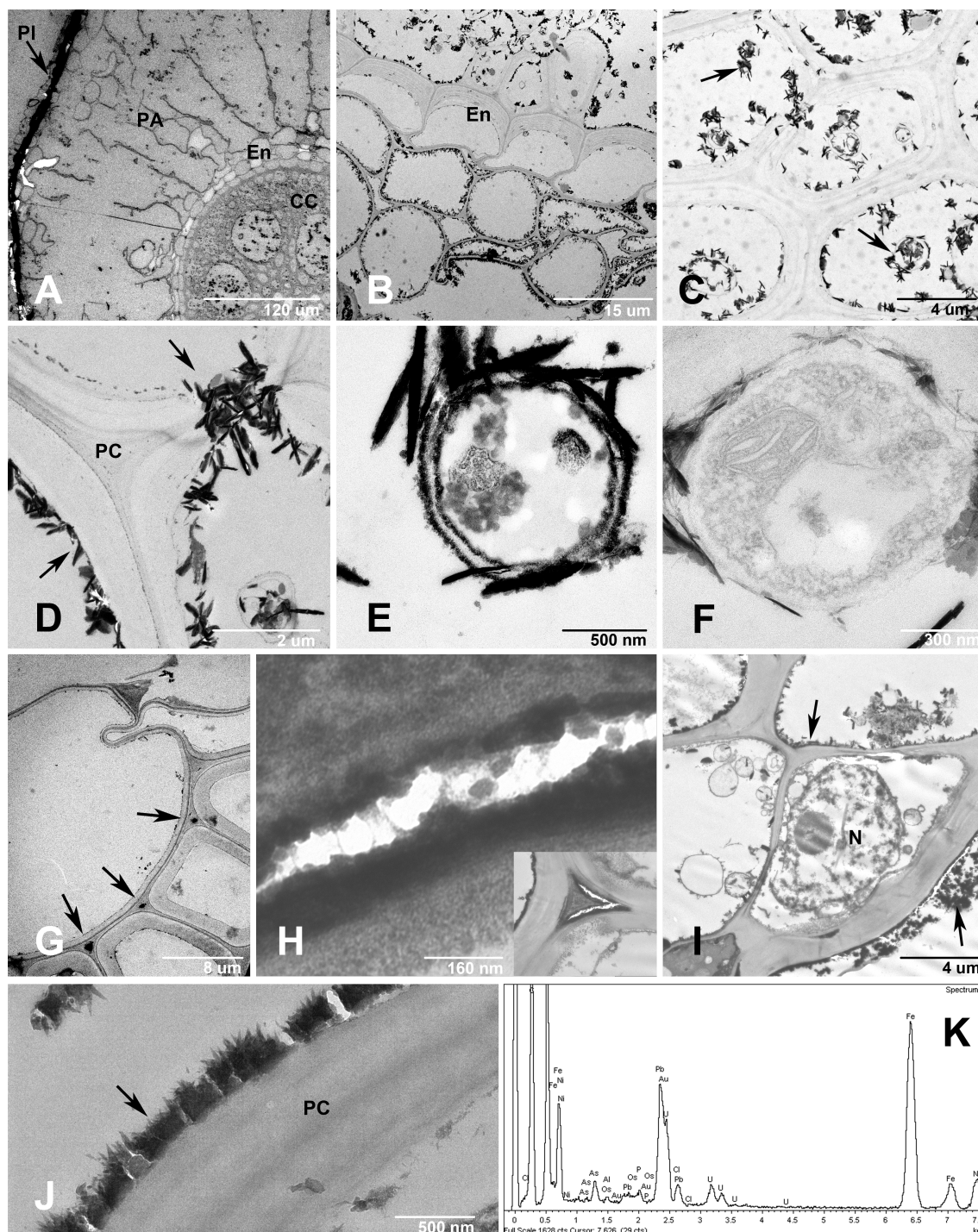


Figura 27: Imágenes representativas de TEM de *I. cylindrica*. (PI=placa de hierro; PA=parénquima aerífero; En=endodermis; CC=cilindro central; PC=pared celular; N=núcleo). **A:** Sección transversal de raíz. Se observa la placa de Fe en la epidermis y depósitos de Fe tanto en el cortex como en el cilindro central. **B:** Detalle de la endodermis de la raíz, con partículas de Fe tanto en el cortex como en el cilindro central. **C:** Orgánulos y paredes celulares cubiertas de Fe en la raíz. **D:** Detalle de espículas de Fe atravesando las paredes celulares en la raíz. **E:** Orgánulo (amiloplasto) con las membranas recubiertas de Fe y espículas, y en cuyo interior se aprecian depósitos de Fe. **F:** Detalle de orgánulo (plasto). **G** y **H:** Localización y detalle de espacios intercelulares saturados de nanopartículas de Fe en la vaina de los haces vasculares del rizoma. **I:** Sección transversal de rizoma con partículas de Fe recubriendo las paredes celulares. **J:** Detalle de pared celular cubierta con partículas y espículas de Fe agrupadas, en la raíz de un espécimen de campo. **K:** Espectro EDX representativo de las partículas de Fe.

constituido por xilema y floema. Los depósitos negros observados corresponden a material electrodensos constituidos en su mayor parte por partículas que se agrupan formando una capa de espesor variable, y en ocasiones prácticamente continua, sobre las membranas de los orgánulos y también en la pared celular (Figura 27 B, D y E). También están presentes en los espacios intercelulares (Figura 27 G, H y J). Los análisis EDX confirman la presencia de Fe en la composición de todas las estructuras observadas (Figura 27 K).

En las muestras analizadas de tejidos de *I. cylindrica* creciendo en su ambiente natural, se observan las mismas formaciones que en las muestras de laboratorio, si bien las aglomeraciones de partículas y espículas son más densas, creando una cubierta más compacta sobre las paredes celulares (Figura 27 J).

Difracción de Rayos X:

El espectro de difracción de rayos-X indica la presencia de jarosita y óxidos de hierro en raíces y rizomas de *I. cylindrica*.

Discusión

Al final del experimento las concentraciones de Fe obtenidas son muy elevadas en la raíz, seguida del rizoma y las hojas. La mayor concentración de Fe se encuentra en raíces y rizomas, en consonancia con los resultados obtenidos por Rodríguez et al. (2005).

En el experimento realizado se observa que a partir de los 15 días las concentraciones obtenidas superan los valores considerados normales para plantas vacuolares. Las raíces alcanzan concentraciones por encima de los valores fitotóxicos (1000-3000 mg/kg, Kabata-Pendias, 2001) desde la primera medida, y, al final del experimento, su concentración es incluso mayor que la que estos autores señalan para plantas adaptadas a entornos metalíferos, en rangos que pueden considerarse de hiperacumulación. Rizomas y hojas también sobrepasan los valores fitotóxicos tras los 60 días de tratamiento, si bien sus concentraciones son significativamente inferiores que las de la raíz y se mantienen en valores esperables para plantas adaptadas a entornos metalíferos.

Es probable que la acumulación de Fe en las raíces de la planta sirva como protección y evite la entrada masiva de este elemento en rizomas y hojas. La importancia de los tejidos de la raíz en la retención de los metales pesados ha sido comprobada en numerosas ocasiones (Ye et al., 1998; Chabbi et al., 1999; Vesik et al., 1999; Liu et al., 2005; Du et al., 2013). Este comportamiento ha sido detectado también en otras gramíneas, como *Phragmites australis* (Fürst et al., 1999) y *Cynodon dactylon* (Franco et al., 2013), en las que la retención del Fe en la raíz es probablemente la estrategia más importante en la protección del rizoma.

Durante el experimento observamos un incremento en la producción de raíces, por lo que deducimos que la planta puede sustituir con mayor rapidez las raíces dañadas por el exceso de Fe que el resto de órganos. Taggart et al. (2009) también encuentran un incremento en la producción de raíces secundarias en *Typha latifolia* creciendo en un medio de características extremas.

Pese a este comportamiento aparentemente excluyente, las altas concentraciones de Fe en hojas y rizomas, sin presentar muestras de un daño estructural que comprometa su función y desarrollo, nos señalan que, además de la retención en las raíces, los tejidos de *I. cylindrica* deben ser altamente tolerantes al exceso de Fe, existiendo probablemente algún mecanismo adicional de protección/detoxificación.

Las observaciones de microscopía también muestran una gran acumulación de partículas de Fe en la raíz, en comparación con rizomas y hojas, justificando los coeficientes de translocación obtenidos. Las gramíneas pueden captar tanto el Fe^{2+} disuelto en el medio ácido, como el Fe^{3+} menos soluble, mediante la liberación de fitosideróforos, tanto al medio exterior como al apoplasto (Schmidt, 2003).

En el experimento hemos conseguido la reproducción de la placa en la raíz, donde es perfectamente visible tanto por SEM como por TEM. La composición obtenida en los análisis SEM-EDX confirman la presencia de Fe, S, K y P sugiriendo la presencia de jarosita. Esto coincide con los resultados obtenidos por Rodríguez et al. (2005) en especímenes de campo. Los resultados XRD confirman la presencia de jarosita en las raíces de esta especie. Según está indicado en varios trabajos la composición de la placa de Fe es variable (Bacha y Hossner, 1977; St-Cyr et al., 1993; Snowden y Wheeler, 1995; Chen et al., 2008; Hu et al., 2007).

Las imágenes de SEM también muestran una gran acumulación de partículas Fe, S y K en el interior de las epidermis, parénquimas corticales y en el xilema y floema del cilindro vascular de raíces y rizomas, en forma de partículas sueltas, aglomeraciones de partículas, o células colapsadas.

Los espectros obtenidos a partir de las imágenes de TEM muestran una composición principalmente de Fe, por lo que se concluye que es bastante probable que el Fe observado en el interior de las células se encuentre mayoritariamente en forma de óxidos. Esos óxidos se observan principalmente rodeando orgánulos y células, y también en los espacios intercelulares. La presencia de ferritina se ha puesto de manifiesto en raíz, hojas y rizoma de *I. cylindrica* mediante análisis inmunocitoquímico (Fuente et al. 2012). Estos óxidos de Fe y su localización podrían estar relacionados de algún modo con esta proteína.

Los resultados nos indican que *I. cylindrica*, pese a ser una especie hiperacumuladora de Fe, concentra la mayor cantidad de este elemento en sus raíces, regulando en cierta medida su translocación a las partes aéreas y a los tejidos de reserva (en el rizoma). No obstante todos los tejidos tanto de partes subterráneas como aéreas alcanzan y resisten altas concentraciones de Fe, y nuestros resultados señalan que la biomineralización juega un papel importante en esta tolerancia, reduciendo la toxicidad del metal.

La facilidad de reproducción de *I. cylindrica* y el gran desarrollo de su sistema rizomatoso permiten a su vez la producción de suficiente cantidad de biomasa, lo que implica un mayor secuestro e inmovilización del Fe. El hecho de que su sistema rizomatoso no se desarrolle solamente en superficie, sino que alcance profundidades de hasta 50 cm (Rajesh y Shrivastva 2014) permite una mayor estabilización del suelo y la descontaminación de capas más profundas a las que no se llegaría con otras especies.

I. cylindrica es a su vez tolerante a múltiples metales pesados como el Pb (Paz-Alberto et al., 2007), Cu, Zn, Sn (Ashraf et al., 2011), Cr, Ni y Co (Abidemi, 2013) evitando su absorción, y ha sido observada colonizando entornos mineros altamente contaminados en minas de Pb-Zn (Yan et al., 2006; Li et al., 2007). Estas características hacen de *I. cylindrica* una especie con un gran uso potencial en programas de estabilización de suelos contaminados, secuestrando el Fe y otros metales pesados en las raíces y a su vez manteniendo las mayores concentraciones alejadas de las partes fácilmente accesibles a

RESUMEN DE RESULTADOS PRINCIPALES

otros seres vivos. Además, hemos comprobado que se puede reproducir el carácter hiperacumulador de *I. cylindrica* en condiciones controladas, alcanzando también la formación de jarosita y nanopartículas de óxidos de Fe en el laboratorio.

CONCLUSIONES FINALES

Nerium oleander, es la especie dominante de los adelfares de la serie de vegetación edafohigrófila y acidófila metalícola en la ribera del río Tinto. Las raíces, en su medio natural, concentran Fe, Cu, Pb y As, aunque no alcanza valores de acumulación. En las superficies epidérmicas de la raíz se forma una placa de hierro sobre la que se depositan otros metales como Pb, Cu, Mn y As. Se confirma por tanto el carácter excluyente de esta especie como mecanismo de tolerancia a las altas concentraciones de metales pesados.

N. oleander, en este ambiente ácido, es acumuladora de los macronutrientes Ca, Mg y K, los cuales se encuentran en los parénquimas corticales y en la médula de hojas y tallos. Se han detectado mediante SEM-EDX drusas y cristales prismáticos de oxalatos de Ca y Mg. Esto es común en los individuos procedentes de cursos de aguas rojas y de aguas claras.

Los individuos de *N. oleander* procedentes de cursos de aguas claras sometidos a una disolución artificial ($\text{pH} = 1,8$) y con altas concentraciones de metales pesados, presentan una mayor resistencia a la absorción de metales, algo común en ecotipos no tolerantes, mientras que los procedentes de aguas rojas sometidos a las mismas condiciones absorben los metales proporcionalmente a la concentración añadida en la disolución. No obstante, al final del experimento no existen diferencias significativas en las concentraciones máximas de los metales estudiados alcanzadas por ambos tipos de plantas.

Durante el tiempo de crecimiento de las adelfas la formación de la placa de Fe es progresiva. Al final del periodo experimental ésta es aún incipiente, por lo que no llega a suponer una barrera a la entrada de iones, produciéndose una entrada masiva de metales a toda la planta por encima de los valores observados en su entorno natural. Esto nos permite concluir que la completa formación de una placa de hierro es fundamental en la exclusión de metales pesados en *N. oleander*.

Sometidas a un medio artificial altamente ácido y rico en metales simulando las condiciones más extremas del río Tinto, las plántulas de ambos tipos de agua alcanzan concentraciones de hiperacumulación de Fe y Cu. Estas condiciones no permiten la supervivencia de las plántulas, por lo que concluimos que en su medio natural han de estar sometida a variaciones estacionales que permitan su germinación y desarrollo, condiciones que no se han reproducido en el tratamiento experimental.

CONCLUSIONES FINALES

De todo lo expuesto, se deduce que *N. oleander* es una especie con un gran potencial en fitoestabilización, favorecida por su facilidad de germinación y por su perfecta adaptación a las condiciones extremas del río Tinto. Además, dada la alta capacidad de absorción de Fe y Cu durante sus primeros estadios de desarrollo, pueden usarse en programas de fitoextracción por blastofiltración en balsas de residuos ácidos.

Cynodon dactylon, especie de los prados vivaces de la geoserie edafohigrófila, en este entorno es también una planta excluyente de Fe. Las raíces concentran niveles de hiperacumulación en forma de una densa placa de hierro en las superficies epidérmicas. Rizomas y hojas mantienen la concentración de Fe dentro de los valores normales para plantas vasculares.

La concentración de Fe en las raíces de *C. dactylon* sometida a un tratamiento con disolución Hoagland ácida (pH = 2) y enriquecida en Fe no alcanza los valores que observamos en su entorno natural. La ausencia de una placa de hierro completamente formada durante el tiempo experimental es la causa de esta diferencia de concentración.

C. dactylon, tanto en su hábitat natural como las plantas cultivadas, mantiene la concentración de Fe en el rizoma por debajo de los valores fitotóxicos. El exceso de hierro y la ausencia de una placa completamente formada provoca que los individuos de *C. dactylon* transloquen rápidamente el Fe desde la raíz hasta sus hojas, evitando su acumulación en el rizoma, donde están sus tejidos de reserva.

El desarrollo radicular observado en *C. dactylon*, junto con las altas concentraciones de Fe retenidas por sus raíces, permiten que sea una especie a tener muy en cuenta en programas de fitoestabilización y rizofiltración.

Imperata cylindrica, especie graminoide de las riberas de ambientes ácidos del tramo medio del río Tinto, es una especie hiperacumuladora de Fe. El carácter hiperacumulador se mantiene en individuos de *I. cylindrica* cultivados bajo condiciones controladas, en una disolución nutritiva Hoaglan a pH 3 y enriquecida en Fe.

La mayor concentración de Fe observada en *I. cylindrica* se encuentra en la raíz, seguida de los rizomas y por último de las hojas. Este patrón indica una regulación de la translocación a las partes aéreas y a los tejidos de reserva en el rizoma.

No obstante, las altas concentraciones de Fe obtenidas tanto en rizomas como en hojas de *I. cylindrica* indican una alta tolerancia de todos sus tejidos al exceso de este metal, sin mostrar daño alguno a nivel estructural.

En el caso de *I. cylindrica* se ha conseguido durante el tiempo experimental la formación de una placa de hierro completa constituida por Fe, S, K y P.

En el experimento de laboratorio se ha conseguido la producción de biominerales de óxidos de Fe y jarosita en el interior de células y tejidos de *I. cylindrica*. Las observaciones de TEM sugieren que los óxidos de Fe están ligados principalmente al interior celular. Los espectros obtenidos mediante microscopía de barrido, indican que la jarosita se encuentra sobre todo en espacios intercelulares, así como en la placa y el cilindro central.

I. cylindrica también es acumuladora de Si. Éste se encuentra distribuido por toda la planta, tanto en los tejidos, formando parte de las paredes celulares, como concentrado en diferentes células en forma de cuerpos de sílice, células con el lumen colapsado de silicio, y en la endodermis de las raíces, en cuyas células se observan depósitos minerales con formas cónicas. Los depósitos de Si observados tienen una estructura más o menos densa, en ocasiones asociada a una matriz orgánica.

I. cylindrica es por tanto una especie idónea para la recuperación de entornos ácidos ricos en Fe, secuestrándolo en forma jarosita y óxidos de Fe principalmente en sus tejidos subterráneos. Además, sus gran desarrollo rizomatoso favorece la estabilización del suelo, y su fácil reproducción asegura una producción constante de biomasa.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdolzadeh, A., Shima, K., Lambers, H., Chiba, K. (2008). Change in uptake, transport and accumulation of ions in *Nerium oleander* (Rosebay) as affected by different nitrogen sources and salinity. *Ann. Bot.* 102: 735- 746.
- Abidemi, O.O. (2013). Accumulation and contamination of heavy metals in soil and vegetation from industrial area of Ikirun, Osun state, Nigeria. *Glob. J. Pure Appl. Chem. Res.* 1(1): 25-34.
- Aksoy, A., Öztürk, M.A. (1997). *Nerium oleander* L. as a biomonitor of lead and other heavy metal pollution in Mediterranean environments. *Sci. Total Environ.* 205: 145-150.
- Alassimone, J., Roppolo, D., Geldner, N., Vermeer, J.E.M. (2012). The endodermis - development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249: 433-435.
- Almodóvar, G.R., Sáez, R., Pons, J., Maestre, A., Toscano, M., Pascual, E. (1998). Geology and genesis of the Aznalcóllar ore deposits, Iberian Pyrite Belt, Spain. *Miner. Deposita* 33: 111-136.
- Amils, R., Fuente, V., Rodríguez, N., Zuluaga, J., Menéndez, N., Tornero, J. (2007). Composition, speciation and distribution of iron minerals in *Imperata cylindrica*. *Plant Physiol. Bioch.* 45: 335-340.
- Amils, R., González-Toril, E., Fernández-Remolar, D., Gómez, F., Rodríguez, N., Durán, C. (2003). Interaction of the sulfur and iron cycles, the Tinto River case. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 1: 299-309.
- Amils, R., González-Toril, E., Gómez, F., Fernández-Remolar, D., Rodríguez, N., Malki, M., Zuluaga, J., Aguilera, A., Amaral-Zettler, L.A. (2004). Importance of chemolithotrophy for early life on earth: The Tinto River (Iberian Pyritic Belt) Case. En: Seckbach, J. (ed.). *Origins: Genesis, Evolution and Diversity of Life*. pp. 463-480. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Amor, A., Ladero, M., Valle, C.J. (1993). Flora y vegetación de la comarca de la Vera y laderas meridionales de la Sierra de Tormantos (Cáceres, España). *Stud. Bot.* 11: 11-207.
- Anoliefo, G.O., Ikhajiagbe, B., Okonokhua, B.O., Edegbai, B.O., Obasuyi, D.C. (2008). Metal tolerant species distribution and richness in and around the metal based industries: Possible candidates for phytoremediation. *Afr. J. Environ. Sci. Technol.* 2(11): 360-370.
- Asensi, A., Díez-Garretas, B. (1987). Andalucía occidental. En: Peinado, M., Rivas-Martínez, S. (eds.), *La vegetación de España*. pp. 199-230. Universidad de Alcalá de Henares.
- Ashraf, M.A., Maah, M.J., Yusoff, I. (2011). Heavy metals accumulation in plants growing in ex tin mining catchment. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 8(2): 401-416.
- Bacha, R.E., Hossner, L.R. (1977). Characteristics of coatings formed on rice roots as affected by iron and manganese additions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 931-935.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. *J. Plant Nutr.* 3: 643-654.
- Baker, A.J.M. (1987). Metal tolerance. *New Phytol.* 106: 93-111.
- Baker, A.J.M., Walker, P.L. (1990). Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants, heavy metal tolerance in plants. En: Shaw, A.J., (ed.): *Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects*. pp. 155-177. CRC Press, Boca Raton.
- Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Hajar, A.S.M. (1994). Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J.&C. Presl. (Brassicaceae). *New Phytol.* 121: 61-68.
- Bani, A., Echevarria, G., Sulce, S., Morel, J.L., Mullai, A. (2007). In-situ phytoextraction of Ni by a native population of *Alyssum murale* on an ultramafic site (Albania). *Plant Soil* 293: 79-89.

- Bañuelos, G.S., Shannon, M.C., Ajwa, H., Draper, J.H., Jordahl, J., Licht, L. (1999). Phytoextraction and accumulation of boron and selenium by poplar (*Populus*) clones. *Int. J. Phytoremed.* 1: 81-96.
- Bargagli, R. (1998). Trace elements in terrestrial plants: An ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery. Springer-Verlag, Berlin. (324 pp).
- Batty, L.C., Baker, A.J.M., Wheeler, B.D., Curtis, C.D. (2000). The effect of pH and plaque on the uptake of Cu and Mn in *Phragmites australis* (Cav.) Trinex. Steudel. *Ann. Bot.* 86: 647–653.
- Bellinfante, N., Heredia, J., Paneque, G. (1980). Alteración de rocas y formación de suelos en el área del Riotinto (Huelva) I. Estudio micromorfológico. *An. Edafología y Agrobiología* 39 (11-12): 1859-1867.
- Belmonte, D. (1986). Estudio de la flora y vegetación de la comarca y sierra de Las Corchuelas. Parque Natural de Monfragüe, Cáceres. Tesis Doctoral. Madrid.
- Berazaín, R., Fuente, V., Sánchez-Mata, D., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R. (2007a). Nickel localization on tissues of hyperaccumulator species of *Phyllanthus* L. (Euphorbiaceae) from ultramafic areas of Cuba. *Biol. Trace Elem. Res.* 115: 67-86.
- Berazaín, R., Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Díez-Garretas, B., Sánchez-Mata, D., Asensi, A. (2007b). Nickel localization in tissues of different hyperaccumulator species of Euphorbiaceae from ultramafic areas of Cuba. *Plant Soil* 293(1): 99-106.
- Björkman, O., Powles, S.B. (1984). Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* 161: 490-504.
- Borissow, G. (1924). Über die eigenartigen Kieselkörper in der Wurzelendodermis bei Andropogon-Arten. *Ber Dtsch Botanischen Ges* 42: 366-380.
- Borissow, G. (1925). Rasdorskys Körpchen bei Ravenna-Gras. *Ber Dtsch Botanischen Ges* 43: 178-184.

- Borissow, G. (1928). Weiteres über die Rasdorskyschen Körpchen. Ber Dtsch Botanischen Ges 46: 463-480.
- Boularbah, A., Bitton, G., Morel, J.L., Schwartz, C. (2000). Assessment of metal accumulation in plants using MetPAD, a toxicity test specific for metal toxicity. Environ. Toxicol. 15 (5): 449-455.
- Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Aboudrar, W., Ouhammou, A., Morel, J.L. (2006). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. Chemosphere 63: 811-817.
- Bradshaw, A. (1997). Restoration of mined lands using natural processes. Ecol. Eng. 8: 255-269.
- Braungardt, C.B., Achterberg, E.P., Elbaz-Poulichet, F., Morley, N.H. (2003). Metal biogeochemistry in a mine-polluted system in Spain. Appl. Geochem. 18: 1757-1771.
- Briat, J.F., Duc, C., Ravet, K., Gaymard, F. (2010). Ferritins and iron storage in plants. Biochim. Biophys. Acta 1800: 806-814.
- Brooks, R.R., Lee, J., Reeves, R.D., Jaffre, T. (1977) Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. J. Geochem. Explor. 7: 49-77.
- Brooks, R.R., Robinson, B.H., Howes, A.W., Chiarucci, A. (2001). An evaluation of *Berkheya coddii* Roessler and *Alyssum bertolonii* Desv. for phytoremediation and phytomining of nickel. S. Afr. J. Sci. 97: 558-560.
- Buckby, T., Black, S., Coleman, M.L., Hodson, M.E. (2003). Fe-sulphate-rich evaporite mineral precipitates from the Rio Tinto, Southwest Spain. Mineral. Mag. 67(2): 263-278.
- Cabezudo, B., Pérez-Latorre, A. (1999). Notas sobre la vegetación de Andalucía I. Acta Bot. Malacitana 24: 247-256.

- Cabezudo, B., Rivera, J. (1980). Notas taxonómicas y corológicas sobre la flora de Andalucía occidental, 2: *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera sp. nov. *Lagascalia* 9 (2): 223-226.
- Cabezudo, B., Nieto, J.M., Pérez-Latorre, A. (1989). *Junco rugosi-Ericetum andevalensis* as. nov. Contribuciones a la flora de Andalucía y del Rif. *Acta Bot. Malacitana* 14: 294-296.
- Caille, N., Swanwick, S., Zhao, F.J., McGrath, S.P. (2004). Arsenic hyperaccumulation by *Pteris vittata* from arsenic contaminated soils and the effect of liming and phosphate fertilisation. *Environ. Pollut.* 132: 113-120.
- Cano, E., García, A., Sánchez, N. (1993). Vegetación de la Cordillera Mariánica y cuenca del Guadiana. Departamento de Biología Vegetal. Universidad de Jaén.
- Cánovas, C.R., Hubbard, C.G., Olías, M., Nieto, J.M., Black, S., Coleman, M.L. (2008). Hydrochemical variations and contaminant load in the Río Tinto (Spain) during flood events. *J. Hydrol.* 350: 25-40.
- Cánovas, C.R., Olías, M., Nieto, J.M., Sarmiento, A.M., Cerón, J.C. (2007). Hydrogeochemical characteristics of the Tinto and Odiel rivers (SW Spain). Factors controlling metal contents. *Sci. Total Environ.* 373: 363-382.
- Chabbi, A. (1999). *Juncus bulbosus* as a pioneer species in acidic lignite mining lakes: interactions, mechanism and survival strategies. *New Phytol.* 144: 133-142.
- Chatterjee, S., Chetia, M., Singh, L., Chattopadhyay, B., Datta, S., Mukhopadhyay, S.K. (2011). A study on the phytoaccumulation of waste elements in wetland plants of a Ramsar site in India. *Environ. Monit. Assess.* 178: 361-371.
- Chen, X.P., Kong, W.D., He, J.Z., Liu, W.J., Smith, S.E., Smith, F.A., Zhu, Y.G. (2008). Do water regimes affect iron-plaque formation and microbial communities in the rhizosphere of paddy rice?. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 171: 193-199.
- Costa, J.C., Lousã, M., Espírito-Santo, M.D. (1996). A vegetação do parque natural da Ria Formosa (Algarve, Portugal). *Stud. Bot.* 15: 69-157.

- Cowley, J.M., Janney, D.E., Gerkin, R.C., Buseck, P.R. (2000). The structure of ferritin cores determined by electron nanodiffraction. *J. Struct. Biol.* 131: 210-216.
- Crowder, A., St-Cyr, L. (1991). Iron oxide plaques on wetland roots. *Trends Soil Sci.* 1: 315–329.
- Danh, L.T., Truong, P., Mammucari, R., Tran, T., Foster, N. (2009). Vetiver grass, *Vetiveria zizanioides*: a choice plant for phytoremediation of heavy metals and organic wastes. *Int. J. Phytoremed.*, 11: 664-691.
- De la Torre, M.L., Grande, J.A., Graiño, J., Gómez, T., Cerón, J.C. (2011). Characterization of AMD pollution in the river Tinto (SW Spain). Geochemical comparison between generating source and receiving environment. *Water Air Soil Pollut.* 216: 3-19.
- De Vos, C.H.P., Vooijs, R., Schat, H., Ernst, W.H.O. (1989). Copper-induced damage to the permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. *J. Plant Physiol.* 135: 165–169.
- Demmig, B., Winter, K., Kruger, A., Czygan, F. (1988). Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol.* 87: 17–24.
- Devesa, J.A. (1995). Vegetación y flora de Extremadura. Universitas Editorial. Badajoz. 773 pp.
- Dickinson, N.M. (2000). Strategies for sustainable Woodland on contaminated soils. *Chemosphere* 41: 259-263.
- Dickinson, N.M., Baker, A.J.M., Doronilla, A., Laidlaw, S., Reeves, R.D. (2009). Phytoremediation of inorganics: Realism and synergies. *Int. J. Phytoremed.* 11(2): 97-114.
- Dickinson, N.M., Hartley, W., Uffindell, L.A., Plumb, A., Rawlinson, H., Putwain, P. (2005). Robust descriptors of soil health for use in reclamation of brownfield land. *Land Contamin. Reclama.* 13: 317-326.

- Dowdy, D.L., McKone, T.E. (1997). Predicting plant uptake of organic chemicals from soil or air using octanol/water and octanol/air partitioning ratios and a molecular connectivity index. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 (12): 2448-2456.
- Du, J., Yan, C., Li, Z. (2013). Formation of iron plaque on mangrove *Kandalar obovata* (S.L.) root surfaces and its role in cadmium uptake and translocation. *Mar. Pollut. Bull.* 74: 105-109.
- Ellenberg, H. (1979). Indicator values of vascular plants in Central Europe. *Scripta Geobotanica* 9: 7-122.
- Enstone, D.E., Peterson, C.A., Ma, F. (2003). Root endodermis and exodermis; structure, functions, and responses to the environment. *J Plant Growth Regul.* 21(4): 335-351.
- Ernst, W.H.O. (1996). Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Appl. Geochem.* 11: 163-167.
- Fayiga, A.O., Ma, L.Q., Cao, X., Rathinasabapathi, B. (2004). Effects of heavy metals on growth and arsenic accumulation in the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environ. Pollut.* 132: 289-296.
- Feng, J.P., Shi, Q.H., Wang, X.F., Wei, M., Yang, F.J., Xu, H.N. (2010). Silicon supplementation ameliorated the inhibition of photosynthesis and nitrate metabolism by cadmium (Cd) toxicity in *Cucumis sativus* L. *Sci. Hortic.* 123: 521-530.
- Fernández, A.J., Rossini, A.J. (2006). The composition and relationships between trace element levels in inhalable atmospheric particles (PM10) and in leaves of *Nerium oleander* L. and *Lantana camara* L. *Chemosphere* 62: 1665-1672.
- Francesconi, K., Visoottiviseth, P., Sridokchan, W., Goessler, W. (2002). Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, *Pityrogramma calomelanos*: A potential phytoremediator of arsenic-contaminated soils. *Sci. Total Environ.* 284: 27-35.

- Franco, A., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Fuente, V. (2013). Iron absorption, localization, and biomineralization of *Cynodon dactylon*, a perennial grass from the Río Tinto basin (SW Iberian Peninsula). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 176: 836-842.
- French, C.J., Dickinson, N.M., Putwain, P.D. (2006). Woody biomass phytoremediation of contaminated brownfield land. *Environ. Pollut.* 141: 387-395.
- Fuente, V., Rufo, L. (2005). Fitorremediación. En: Marin, I., Sanz, J.L., Amils, R., (eds.). *Biotechnología y Medioambiente*. Editorial Ephemera. Madrid, España.
- Fuente, V., Rodríguez, N., Amils, R. (2012) Immunocytochemical analysis of the subcellular distribution of ferritin in *Imperata cylindrica* (L.) Raeuschel, an iron hyperaccumulator plant. *Acta Histochem.* 114: 232-236.
- Fuente, V., Rodríguez, N., Díez-Garretas, B., Rufo, L., Asensi, A., Amils, R. (2007a). Nickel distribution in the hyperaccumulator *Alyssum serpyllifolium* Des. spp. from the Iberian Peninsula. *Plant Biosyst.* 141(2): 170-180.
- Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils R. (2007b). Los adelfares del suroeste de la Península Ibérica. *Lazaroa* 28: 5-14.
- Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Moreno, R., Sánchez-Mata, D., Amils, R. (2008). Comunidades de *Spartinetea Maritimae* Tüxen in Beefink & Géhu 1973 en el suroeste ibérico. En: Redondo, M.M., Palacios, M.T., López, F.J., Santamaría, T., Sánchez-Mata, D., (eds.). *Avances en Biogeografía*. pp. 69-75. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.
- Fuente, V., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Zuluaga, J. (2010). Metal accumulation screening of the Río Tinto flora (Huelva, Spain). *Biol. Trace Elem. Res.* 134: 318 - 341.
- Fürtig, K., Pavelic, D., Brunold, C., Brändle, R. (1999). Copper- and Iron-induced injuries in roots and rhizomes of reed (*Phragmites australis*). *Limnologica* 29: 60–63.

- Galán de Mera, A., Sánchez, I., Vicente, J.A. (1997). Coastal plant communities of the southwestern Iberian Peninsula, Spain and Portugal. *Phytocoenologia* 27 (3): 313-352.
- Galán, E., Gómez-Ariza, J.L., González, I., Fernández-Caliani, J.C., Morales, E., Giráldez, I. (2003). Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt. *Appl. Geochem.* 18: 409-421.
- Gálvez, N., Fernández, B., Sánchez, P., Cuesta, R., Ceolín, M., Clemente-León, M., Trasobares, S., López-Haro, M., Calvino, J.J., Stéphan, O., Domínguez-Vera, J.M. (2008). Comparative structural and chemical studies of ferritin cores with gradual removal of their iron contents. *J. Am. Chem. Soc.* 130: 8062-8068.
- García, A., Torres, J.A., Pinto, C.J., Leite, A.M., Salazar, C., Melendo, M., Nieto, J., Cano, E. (1998). *Fresnedas del sur y occidente de la Península Ibérica. Itinera Geobotanica* 11: 299-314.
- González, C.L., Heilman, M.D. (1977). Yield and chemical composition of coastal Bermuda grass, Rhodes grass and volunteer species grown on saline and non-saline soils. *J. Range Manage.* 30: 227-230.
- Greuter, W., Burdet, H.M., Long, G. (eds) (1984-1989): *Med-Checklist*. Vols. 1, 3 & 4. – Conserv. Jard. Bot. Genève, Genève.
- Hanna, W.W. (1992). *Cynodon dactylon*. En: 'tMannetje, L., Jones, R.M. (eds). *Plant resources of south-east Asia*. No 4: Forages. pp. 100-102. Pudoc Scientific Publishers, Wageningen.
- Harlan, J.R. (1970). *Cynodon* species and their value for grazing or hay. *Herb. Abstr.* 40: 233-238.
- Harrison, C.C. (1996). Evidence for intramolecular macromolecules containing protein from plant silicas. *Phytochemistry* 41: 37-42.
- Heredia, J., Bellinfante, N., Paneque, G. (1980a). Alteración de rocas y formación de suelos en el área del Riotinto (Huelva) I. Factores ecológicos. *An. Edafología y Agrobiología* 39 (11-12): 1253-1259.

- Heredia, J., Bellinfante, N., Paneque, G. (1980b). Alteración de rocas y formación de suelos en el área del Riotinto (Huelva) II. Estudio morfológico y propiedades generales de los suelos. *An. Edafología y Agrobiología* 39 (11-12): 1845-1857.
- Hodson, M.J., Sangster, A.G. (1989a). Subcellular localization of mineral deposits in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Protoplasma* 151: 19-32.
- Hodson, M.J., Sangster, A.G. (1989b). X-ray microanalysis of the seminal root of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. with particular reference to silicon. *Ann Bot Lond* 64: 659-667.
- Hodson, M.J., White, P.J., Mead, A., Broadley, M.R. (2005). Phylogenetic variation in the silicon composition of plants. *Ann. Bot. London* 96: 1027–1046.
- Horowitz, M. (1972). Spatial growth of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *Weed Res.* 12: 373–383.
- Hu, Z.Y., Zhu, Y.G., Li, M., Zhang, L.G., Cao, Z.H., Smith, F.A. (2007). Sulfur (S)-induced enhancement of iron plaque formation in the rhizosphere reduces arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Environmental Pollut.* 147: 387-393.
- Huang, J.W.W., Poynton, C.Y., Kochian, L.V., Elless, M.P. (2004). Phytofiltration of arsenic from drinking water using arsenic-hyperaccumulating ferns. *Environ. Sci. Technol.* 38: 3412-3417.
- Hudson–Edwards, K.A., Schell, C., Macklin, M.G. (1999). Mineralogy and geochemistry of alluvium contaminated by metal mining in the Río Tinto area, southwest Spain. *Appl. Geochem.* 14: 1015-1030.
- Huxley, A., Griffiths, M., Levy, M. (1992). The new Royal Horticultural Society dictionary of gardening. London: Macmillan Press.
- I.G.M.E. (1970): Mapa geológico de España escala 1:50.000. Hojas: 938-960-982-999. Servicio. Ministerio de industria y Energía. Madrid.

- Johnson, E.R., Shilling, D.G. (1998). Cogongrass. Plant conservation alliance working group. University of Florida, Weed Science, Florida.
- Jones, C.A. (1985). C4 Grasses and Cereals. Growth, Development and Stress Response. John Wiley and Sons, New York. 419p.
- Jonnalagadda, S.B., Nenzou, G. (1997). Studies on arsenic rich mine dumps. II. The heavy element uptake by vegetation. J. Environ. Sci. Health, Part A. A 32: 455-464.
- Jonnalagadda, S.B., Nenzou, G., Mbere, G. (2002). Derelict mine dumps in eastern Zimbabwe and impact on environment. En: Proceedings of the First Regional Conference on Trace Elements Research in Africa. Trace Element Satellite Research Centre of UNESCO (TESCU), University of Nairobi, Kenya.
- Kabata-Pendias A. (2001). Trace Elements in Soils and Plants, 3rd ed. CRC, Boca Raton, FL, 413p.
- Kadukova, J., Manousaki, E., Kalogerakis, N. (2006). Lead and cadmium accumulation from contaminated soils by *Nerium oleander*. Acta Metall. Slovaca 12: 181-187.
- Kaya, G., Okumus, N., Yaman, M. (2010). Lead, cadmium and copper concentrations in leaves of *Nerium oleander* L. and *Robinia pseudoacacia* L. as biomonitors of atmospheric pollution. Fresen. Environ. Bull. 19: 669-675.
- Keeling, S.M., Stewart, R.B., Anderson, C.W.N., Robinson, B.H. (2003). Nickel and cobalt phytoextraction by the hyperaccumulator *Berkheya coddii*: Implications for polymetallic phytomining and phytoremediation. Int. J. Phytoremed. 5: 235-244.
- Keller, C., Hammer, D., Kayser, A., Richner, W., Brodbeck, M., Sennhauser, M. (2003). Root development and heavy metal phytoextraction efficiency: Comparison of different plant species in the field. Plant Soil 249: 67-81.
- Kim, C., Lemke, C., Paterson, A.H. (2009). Functional dissection of drought responsive gene expression patterns in *Cynodon dactylon* L. Plant Mol. Biol. 70: 1-16.

- King, S.E., Grace, J.B. (2000). The effect of soil flooding on the establishment of cogongrass (*Imperata cylindrica*), a nonindigenous invader of the southeastern united states. *Wetlands* 20: 300-306.
- King, R.F., Royle, A., Putwain, P.D., Dickinson, N.M. (2006). Changing contaminant mobility in a dredged canal sediment during a three-year phytoremediation trial. *Environ. Pollut.* 143: 318-326.
- Klang-Westin, E., Eriksson, J. (2003). Potential of *Salix* as phytoextractor for Cd on moderately contaminated soils. *Plant Soil* 249: 127-137.
- Krupa, Z., Oquist, G., Huner, N.P.A. (1993). The effect of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris*: a fluorescence analysis. *Physiol. Plantarum* 88: 626–630.
- Kuo, S. (1986). Concurrent sorption of phosphate and zinc, cadmium, or calcium by a hydrous ferric oxide. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 50: 1412–1419.
- L'Houérou, H.N. (2003). Bioclimatology and phytogeography of the Red Sea and Aden Gulf Basins: A monograph (with a particular reference to highland evergreen sclerophylls and lowland halophytes). *Arid Land Res. Manag.* 17: 177-256.
- Ladero, M. (1970). Contribución al estudio de la flora y vegetación de las comarcas de la Jara, serranías de Ibor y Villuercas en la Oretana Central. Tesis Doctoral. Madrid.
- Ladero, M. (1974). Aportaciones a la flora luso-extremadurese. *An. I. Bot. A.J. Cavanilles* 31(1): 119-137.
- Ladero, M. (1977). Notas sobre la vegetación de Extremadura (España). *Acta Bot. Malacitana* 3: 169-174.
- Ladero, M., (1987). España Lusoextremadurese. En: Peinado, M., Rivas-Martínez, S. (eds.) *La vegetación de España*. pp. 453-486. Universidad de Alcalá de Henares.
- Ladero, M., Amor, A., (1999). The vegetation of Extremadura: The Badajoz-Talavera de la Reina transect. En: Rivas-Martínez, S., Loridi, J., Costa, M., Díaz, T.E.,

- Penas A., (eds.). Iter Ibericum A.D. MIM. pp: 169-188. Itinera Geobotanica 13: 5-348.
- Ladero, M., Pérez-Chiscano, J.L., Santos, M.T., Amor, A., (1988). Aportaciones a la flora extremeña. Stud. Bot. 7: 219-223.
- Ladero, M., Pérez-Chiscano, J.L., Santos, M.T., Valle, C.J., Amor, A. (1990). Encinares luso-extremadurenses y sus etapas preclimácicas. Acta Bot. Malacitana 15: 323-330.
- Laidlaw, W.S., Arndt, S.K., Huynh, T.T., Gregory, D., Baker, A.J.M. (2012). Phytoextraction of heavy metals by willows growing in biosolids under field conditions. J. Environ. Qual. 41: 134-143.
- Landberg, T., Greger, M. (1996). Differences in uptake and tolerance to heavy metals in *Salix* from unpolluted and polluted areas. Appl. Geochem. 11: 175-180.
- Lanning, F.C., Eleuterius, L.N. (1989). Silica deposition in some C3 and C4 species of grasses, sedges and composites in the USA. Ann. Bot-London 63: 395-410.
- Laue, M., Hause, G., Dietrich, D., Wielage, B. (2007). Ultrastructure and microanalysis of silica bodies in *Dactylis glomerata* L. Microchim. Acta 156: 103-107.
- Li, J., Guo, J., Xu, W., Ma, M. (2006). Enhanced cadmium accumulation in transgenic tobacco expressing the phytochelatase synthase gene of *Cynodon dactylon* L. J. Integr. Plant Biol. 48: 928-937.
- Li, M.S., Luo, Y.P., Su, Z.U. (2007). Heavy metal concentrations in soils and plant accumulation in a restored manganese mineland in Guangxi, South China. Environ. Pollut. 147: 168-175.
- Li, Y.M., Chaney, R.L., Brewer, E.P., Angle, J.S., Nelkin, J. (2003). Phytoextraction of nickel and cobalt by hyperaccumulator *Alyssum* species grown on nickel-contaminated soils. Environ. Sci. Technol. 37: 1463-1468.

- Liu, X.M., Wu, Q.T., Banks, M.K., Ebbs, S.D. (2005). Phytoextraction of Zn and Cu from sewage sludge and impact on agronomic characteristics. *J. Environ. Sci. Health, Part A* 40: 823-838.
- Llagostera, I., Pérez, M., Romero, J. (2011). Trace metal content in the seagrass *Cymodocea nodosa*: Differential accumulation in plant organs. *Aquat. Bot.* 95: 124–128.
- Loidi, J. (1994). Phytosociology applied to nature conservation and land management. En: Song, Y., Dierschke, H., and Wang, X., (eds.). *Applied vegetation ecology. Proceed 35th Symposium IAVS in Shangai*. pp. 17-30. East China Normal Univ. Press.
- López-Archilla, A.I., Marín, I., Amils, R. (2001). Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: the Tinto river, Spain. *Microbial Ecol.* 41: 20-3.
- Lousã, M. (1986). Comunidades halofíticas da Reserva de Castro Marim. Tese de Doutoramento. (Ed.) Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia. 170 p.
- Lousã, M., Costa J.C., Capelo, J.H., Pinto, C., Neto, C. (1999). Overview of the vegetation and landscape of lower Algarve (southern Portugal): siliceous ecosystems, schist, sandy substrata, dunes and saltmarshes. En: Rivas-Martínez, S., Loidi, J., Costa, M., Díaz, T.E., Pena, A., (eds.). *Iter Ibericum A.D. MIM*. pp: 137-148. *Itinera Geobotanica* 13: 5-348.
- Ma, J.F., Takahashi, E. (2002). *Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan*. Elsevier, Amsterdam.
- Ma, J.F., Yamaji, N. (2006). Silicon uptake and accumulation in higher plants. *Trends Plant Sci.* 11: 392–397.
- Ma, J.F., Yamaji, N., Mitani, N., Tamai, K., Konishi, S., Fujiwara, T., Katsuhara, M., Yano, M. (2007a). An efflux transporter of silicon in rice. *Nature* 448: 209–211.

- Ma, J.F., Yamaji, N., Tamai, K., Mitani, N. (2007b). Genotypic difference in Si uptake and expression of Si transporter genes in rice. *Plant Physiol.* 145: 919–924.
- Ma, L.Q., Komar, K.M., Tu, C., Zhang, W., Cai, Y., Kennelley, E.D. (2001). A fern that hyperaccumulates arsenic. *Nature* 409: 579.
- MacDonald, G.E., Brecke, J.B., Gaffney, J.F., Langeland, K.A., Ferrell J.A., Sellers B.A. (2006). Cogongrass (*Imperata cylindrica* (L.) Beauv.) Biology, Ecology and Management in Florida. SS-AGR-52. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Madejón, P., Murillo, J.M., Marañón, T., Cabrera, F., López, R. (2002). Bioaccumulation of As, Cd, Cu, Fe and Pb in wild grasses affected by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain). *Sci. Total Environ.* 290: 105-120.
- Mazen, A.M.A. (2004). Calcium oxalate deposits in leaves of *Corchorus olitorius* as related to accumulation of toxic metals. *Russ. J. Plant Physiol.* 51: 281–285.
- McGrath, S.P., Lombi, E., Gray, C.W., Caille, N., Dunham, S.J., Zhao, F.J. (2006). Field evaluation of Cd and Zn phytoextraction potential by the hyperaccumulators *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri*. *Environ. Pollut.* 141: 115-125.
- McLeod, K.W., Ciravolo, T.G. (1998). Boron tolerance and potential boron removal by bottom land tree seedlings. *Wetlands* 18: 431-436.
- Mekonnen, A. (2000). Handbook on vetivergrass technology – From Propagation to Utilization. GTZ IFSP S/GONDER, Ethiopia.
- Melo, S.P., Monteiro, F.A., Bona, F.D. (2010). Silicon distribution and accumulation in shoot tissue of the tropical forage grass *Brachiaria brizantha*. *Plant Soil* 336: 241-249.
- Mendelssohn, I.A., Kleiss, B.A., Wakeley, J.S. (1995). Factors controlling the formation of oxidized root channels: a review. *Wetlands* 15: 37–46.

- Min, Y., Boquing, T., Meizhen, T., Aoyama, I. (2007). Accumulation and uptake of manganese in a hyperaccumulator *Phytolacca americana*. Miner. Eng. 20 (2): 188-190.
- Mingorance, M.D., Valdés, B., Rossini, S. (2007). Strategies of heavy metal uptake by plants growing under industrial emissions. Environ. Int. 33: 514-520.
- Mitani, N., Chiba, Y., Yamaji, N., Ma, J.F. (2009). Identification and characterization of maize and barley Lsi2-like silicon efflux transporters reveals a distinct silicon uptake system from that in rice. Plant Cell 21(7): 2133-2142.
- Mok, H.F., Majumder, R., Laidlaw, W.S., Gregory, D., Baker, A.J.M., Arndt, S.K. (2013). Native australian species are effective in extracting multiple heavy metals from biosolids. Int. J. Phytoremed. 15(7): 615-632.
- Motomura, H., Mita, N., Suzuki, M. (2002). Silica accumulation in long-lived leaves of *Sasa veitchii* (Carrière) Rehder (Poaceae-Bambusoideae). Ann Bot Lond 90: 149-152.
- Moreira, I. (1975). Propagação por semente do *Cynodon dactylon* (L.) Pers. An. I. S. Agron. 35: 95-112.
- Mukhtar, N., Hameed, M., Ashraf, M., Ahmed, R. (2013). Modifications in stomatal structure and function in *Cenchrus ciliaris* L. and *Cynodon dactylon* (L.) Pers. in response to cadmium stress. Pak. J. Bot. 45(2): 351-357.
- Nakata, P.A. (2003). Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. Plant Sci. 164: 901-909.
- Narayanan, K., Holzhüter, G., Gerber, T. (2004). Study of silica structure in spelt (*Triticum spelta*) by electron microscopy. Proc. EMC 2004, Antwerp, Belgium.
- Nwugo, C.C., Huerta, A.J. (2008). Effects of silicon nutrition on cadmium uptake, growth and photosynthesis of rice plants exposed to low-level cadmium. Plant Soil 311: 73-86.

- Orecchio, S., Amorello, D. (2010). Platinum and rhodium associated with the leaves of *Nerium oleander* L.; analytical method using voltammetry; assessment of air quality in the Palermo (Italy) area. *J. Hazard. Mater.* 174: 720-727.
- Osaliya, R., Kansime, F., Oryem-Origa, H., Kateyo, E. (2011). The potential use of storm water and effluent from a constructed wetland for re-vegetating a degraded pyrite trail in Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Phys. Chem. Earth* 36: 842-852
- Ostman, G. (1994). Cadmium in *Salix* - A study of the capacity of *Salix* to remove cadmium from arable soils. En: Aronsson, P. and Perttu, K. (eds.). *Willow Vegetation Filters for Municipal Waste Waters and Sludges: A Biological Purification System*. pp. 153–155. Uppsala, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Otte, M.L., Rozema, J., Koster, L., Haarsma, M.S., Broekman, R.A. (1989). Iron plaque on roots of *Aster tripolium* L.: Interaction with zinc uptake. *New Phytol.* 111: 310–317.
- Palmer, C.M., Guerinot, M.L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5: 333-340.
- Paz-Alberto, A.M., Sigua, G.C., Bauí, B.G., Prudente, J.A. (2007). Phytoextraction of lead-contaminated soil using vetivergrass (*Vetiveria zizanioides* L.), cogongrass (*Imperata cylindrica* L.) and carabagrass (*Paspalum conjugatum* L.). *Env. Sci. Pollut. Res.* 14(7): 498-504.
- Peng, K., Li, X., Luo, C., Shen, Z. (2006). Vegetation composition and heavy metal uptake by wild plants at three contaminated sites in Xiangxi area, China. *J. Environ. Sci. Health, Part A* 40: 65-76.
- Pérez-Chiscano, J.L. (1975). Vegetación arbórea y arbustiva de las sierra del noroeste de la provincia de Badajoz. Tesis Doctoral. Madrid.
- Pérez-Chiscano, J.L. (1976). Charnecales y madroñales del noroeste de la provincia de Badajoz. *An. I. Bot. A.J. Cavanilles* 33: 219-238.

- Pérez-Chiscano, J.L. (1983). El retamal costero de la desembocadura del río Guadiana. *Lazaroa* 4: 141-147.
- Pérez-Chiscano, J.L. (1994). Los adelfares en la provincia corológica luso-extremadurens (Península Ibérica). *Stud. Bot.* 12: 203-218.
- Pérez-Latorre, A.V. (1993). Estudio fitocenológico de los alcornocales andaluces. Tesis Doctoral. Málaga.
- Pérez-Latorre, A., Nieto, J.M., Cabezudo, B. (1993). Contribución al conocimiento de la vegetación de Andalucía II. Los Alcornocales. *Acta Bot. Malacitana* 18: 223-258.
- Pérez-Latorre, A., Nieto, J.M., Cabezudo, B. (1994a). Datos sobre la vegetación de Andalucía III. Series de vegetación caracterizadas por *Quercus suber*. *Acta Bot. Malacitana* 19: 169-183.
- Pérez-Latorre, A.V., Nieto, J.M., Cabezudo, B. (1994b). Estudio fitosociológico de los alcornocales andaluces. *An. I. S. Agron.* 44: 579-597.
- Pérez-Latorre, A., Navas, P., Nieto, J.M., Cabezudo, B. (1997). Los jarales de la clase Cisto-Lavanduletea en el sur de la Península Ibérica (Andalucía, España). *Acta Bot. Malacitana* 22: 171-185.
- Pérez-Latorre, A., Navas, P., Navas, D., Gil, Y., Cabezudo, B. (2002). Datos sobre la flora y vegetación de la cuenca del río Guadamar (Sevilla-Huelva, España). *Acta Bot. Malacitana* 27: 189-228.
- Piperno, D.R., Pearsall, D.M. (1998). The silica bodies of tropical American grasses: morphology, taxonomy, and implications for grass systematics and fossil phytolith identification. *Ann. Smithsonian Inst.* 85: 1-40.
- Prasad, M.N.V., Freitas, H. (2003). Metal hyperaccumulation in plants: Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron. J. Biotechnol.* 6: 275-321.

- Pulford, I.D., Watson, C. (2003). Phytoremediation of heavy metal contaminated land by trees - A review. *Environ. Int.* 29: 529–540.
- Rajesh, R., Shrivastva, B.K. (2014). Numerical simulation of vegetated mine dump slope with reference to small plants. *Int. J. Min. Sci. Technol.* 24: 111-115.
- Reeves, R.R., Baker, A.J.M. (2000). Metal-accumulating plants. En: Raskin I, Ensley BD (eds.) *Phytoremediation of Toxic Metals*. pp 193–229. Wiley, New York.
- Rivas-Goday, S. (1944). Impotante aplicación del rizoma de *Cynodon dactylon* (L.) Pers. *Farmacognosia* 4: 121-126.
- Rivas-Goday, S. (1964). *Vegetación y flórula de la cuenca extremeña del Guadiana*. Publicación de la Excelentísima Diputación Provincial de Badajoz. 777 pp.
- Rivas-Martínez, S. (1988). Bioclimatología, biogeografía y serie de vegetación de Andalucía occidental. *Lagascalía* 15 (extra): 91-119.
- Rivas-Martínez, S. (2007). Mapa de series, geoserias y geopermaseries de vegetación de España [Memoria del mapa de vegetación potencial de España] Parte I. *Itinera Geobotanica* 17: 1-436.
- Rivas-Martínez, S., Costa, M., Castroviejo, S., Valdés, E. (1980). *Vegetación de Doñana (Huelva, España)*. *Lazaroa* 2: 5-190.
- Rivas-Martínez, S., Lousã, M., Díaz, T.E., Fernández-González, F., Costa, J.C. (1990). La vegetación del sur de Portugal (Sado, Alentejo y Algarve). *Itinera Geobotanica* 3: 5-126.
- Rivera, J. (1980). *Estudio de la flora y vegetación de la sierra de Aracena (Huelva)*. Tesis Doctoral. Sevilla.
- Rivera, J., Cabezudo, B. (1981). Notas taxonómicas y corológicas sobre la flora de Andalucía Occidental. *Notas breves*. *Lagascalía* 10: 95-127.
- Rivera, J., Cabezudo, B. (1985). Aportaciones al conocimiento florístico de la sierra de Aracena (Huelva, España). *Acta Bot. Malacitana* 10: 61-78.

- Robinson, B.H., Brooks, R.R., Howes, A.W., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H. (1997). The potential of the high-biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *J. Geochem. Explor.* 60: 115-126.
- Robinson, B.H., Mills, T.M., Petit, D., Fung, L.E., Green, S.R., Clothier, B.E. (2000). Natural and induced Cd-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant Soil* 227: 301-306.
- Rodríguez, N., Menéndez, N., Tornero, J., Amils, R., Fuente, V. (2005). Internal iron biomineralization in *Imperata cylindrica*, a perennial grass: Chemical composition, speciation and localization. *New Phytol.* 165: 781–789.
- Rodríguez, N., Amils, R., Jiménez-Ballesta, R., Rufo, L., Fuente, V. (2007). Heavy metal content in *Erica andevalensis*: an endemic plant from the extreme acidic environment of Tinto river and its soils. *Arid Land Res. Manag* 21: 51-65.
- Rosselli, W., Keller, C., Boschi, K. (2003). Phytoextraction capacity of trees growing on a metal contaminated soil. *Plant Soil* 256: 265-272.
- Rossini, S., Mingorance, M.D. (2006). Assessment of airborne heavy metal pollution by aboveground plant parts. *Chemosphere* 65: 177-182.
- Rufo, L., Fuente, V. (2008). *Carex reuteriana* subsp. *tartessiana* (Luceño & Aedo) Rivas-Martínez en la cuenca del río Tinto (Huelva, España). *Stud. Bot.* 27:193-196
- Rufo, L., Fuente, V. (2009). La Vegetación dunar costera del suroeste de la Península Ibérica: ríos Tinto, Odiel y Piedras (Huelva, España). *Stud. Bot.* 28: 157-172.
- Rufo, L., Fuente, V. (2010a). Vegetación arbórea y arbustiva de la cuenca del río Tinto (Huelva España). *Lazaroa* 31: 39–58.
- Rufo, L., Fuente, V. (2010b). Successional dynamics of the climatophile vegetation of the mining territory of the Río Tinto (Huelva, Spain): soil characteristics and implications for phytoremediation. *Arid Land Res. Manag.* 24, 301-327.

- Rufo, L., Fuente, V. (2011). Vegetación herbácea vivaz de la cuenca del río Tinto (Huelva, España). *Lazaroa* 32: 73-89.
- Rufo, L., Rodríguez, N., Fuente, V. (2010). Chemical and mineralogical characterization of the soils of the main plant communities of the 'Río Tinto' basin. *Schironia* 9: 5-12.
- Rufo, L., Rodríguez, N., Fuente, V. (2011). Plant communities of extreme acidic waters: the Río Tinto case. *Aquat. Bot.* 95: 129 - 139.
- Rufo, L., Franco, A., Fuente, V. (2013). Silicon in *Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv: content, distribution, and ultrastructure. *Protoplasma* 251 (4): 921-930.
- Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Fuente, V. (2009). Vegetación serial fruticosa y sufruticosa acidófila de la Cuenca del Río Tinto (Huelva España). *Lazaroa* 30: 49–64.
- Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., Fuente, V., Jiménez-Ballesta, R. (2007). Surface geochemistry of soils associated to the Tinto River (Huelva, Spain). *Sci. Total Environ.* 378: 223-227.
- Ruiz, T. (1986). Flora y vegetación vascular del tramo medio del valle del Tiétar y el Campo Arañuelo. Tesis Doctoral. Salamanca.
- Sáez, R., Almodóvar G.R., Pascual E. (1996). Geological constraints on massive sulphide genesis in the Iberian Pyrite Belt. *Ore Geol. Rev.* 11: 429-451.
- Salt, D.E., Blaylock, M.J., Kumar, N.P.B.A., Dushenkov, V., Ensley, B.D., Chet, I., Raskin, I. (1995). A novel strategy for removal of toxic metals from the environment using plants. *Biotechnology* 13: 468-474.
- Sampanpanish, P., Ongsapich, P.W., Khaodhiar, S., Khan, E. (2006). Chromium removal from soil by phytoremediation with weed plant species in Thailand. *Water Air Soil Poll.* 6: 191-206.

- Sangster, A.G., Parry, D.W. (1976). The ultrastructure and electron-probe microassay of silicon deposits in the endodermis of the seminal roots of *Shorgum bicolor* (L.) Moench. *Ann. Bot. Lond.* 40(3): 447-459.
- Santos, M.T. (1987). Vegetación y flora vascular desarrolladas sobre suelos básicos (diabasas y calizas) de la provincia de Cáceres. Tesis Doctoral. Salamanca.
- Sawidis, T., Marnasidis, A., Zachariadis, G., Stratis, J.A. (1995). A study o fair pollution with heavy-metals in Thessaloniki city (Greece) using as biological indicators. *Arch. Environ. Con. Tox.* 28: 118-124.
- Schermerhorn, L.J.G. (1971). An outline of the stratigraphy of the Iberian Pyrite Belt. *B. Geol. Min.* 82: 239–268.
- Schmidt, W. (2003). Iron solutions: acquisition strategies and signaling pathways in plants. *Trends Plant Sci.* 8 (nº 4): 188-193.
- Schwartz, C., Echevarria, G., Morel, J.L. (2003). Phytoextraction of cadmium with *Thlaspi caerulescens*. *Plant Soil* 249: 27–35.
- Sellers, B.A., Ferrell, J.A., MacDonald, G.E., Langeland, K.A., Flory, S.L. (2012). Cogongrass (*Imperata cylindrica*) Biology, Ecology, and Management in Florida Grazing Lands. SS-AGR-52. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Seward, M.R.D., Mashhour, M.A. (1991). *Nerium oleander* as a monitor of heavy metal pollution. En: Öztürk, M.A., Erdem, Ü., Görk, G., (eds). *Urban Ecology*. pp. 48-61. Ege University Press. Izmir (Turkey).
- Sheldon, A.R., Menzies, N.W. (2005). The Effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes Grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. *Plant Soil* 278 (1-2): 341-349.
- Shi, H., Wang, Y., Chen, Z., Ye, T., Chan, Z. (2012). Analysis of natural variation in bermudagrass (*Cynodon dactylon*) reveals physiological responses underlying drought tolerance. *PLoS One* 7, e53422.

- Shu, W.S., Ye, Z.H., Lan, C.Y., Zhang, Z.Q., Wong, M.H. (2002). Lead, zinc and copper accumulation and tolerance in populations of *Paspalum distichum* and *Cynodon dactylon*. Environ. Pollut. 120: 445-453.
- Shu, W.S., Ye, Z.H., Zhang, Z.Q., Wong, M.H., Lan, C.Y. (2003). Restoration of lead and zinc mine tailings in South China. Acta Ecol. Sin. 23(8): 1629–1639 [in Chinese, with English abstract].
- Shukla, S.K., Singh, K., Singh, B., Gautam, N.N. (2011). Biomass productivity and nutrient availability of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. growing on soils of different sodicity stress. Biomass Bioenerg. 35: 3440-3447.
- Skerman, P.J., Riveros, F. (1990). Tropical Grasses. Food and Agriculture Organization of the United Nations Series 23. Rome.
- Smith, R.A.H., Bradshaw A.D. (1979). The use of metal tolerant plant populations for the reclamation of metalliferous wastes. J. Appl. Ecol. 16: 595-612.
- Snowden, R.E.D., Wheeler, B.D. (1995): Chemical changes in selected wetland plant species with increasing Fe supply, with specific reference to root precipitates and Fe tolerance. New Phytol. 131: 503–520.
- Soldevilla, M., Marañón, T., Cabrera, F. (1992). Heavy metal content in soil and plants from a pyrite mining area in southwest Spain. Commun. Soil Sci. Plant 23: 1301–1319.
- Sorrell, B.K. (1999). Effect of external oxygen demand on radial oxygen loss by *Juncus* roots in titanium citrate solutions. Plant Cell Environ. 22: 1587–1593.
- St-Cyr, L., Fortin, D., Campbell, P.G.C. (1993). Microscopic observations of the iron plaque of a submerged aquatic plant (*Vallisneria americana* Minchx). Aquat. Bot. 46: 155-167.
- Straughan, I.R., Elsseewi, A.A., Page, A.L. (1981). An overview of deposition and its impacts on soils. En: Proceedings of the International Conference on Heavy Metals in the Environment. pp. 330-346. Amseterdam.

- Taggart, M.A., Mateo, R., Charnock, J.M., Bahrami, F., Green, A.J., Meharg, A.A. (2009). Arsenic rich iron plaque on macrophyte roots – an ecotoxicological risk?. *Environ. Pollut.* 157: 946-954.
- Taylor, G.J., Crowder, A.A. (1983). Uptake of accumulation of Cu, Ni, and Fe by *Typha latifolia* grown in solution culture. *Can. J. Bot.* 61: 1825–1830.
- Taylor, G.J., Crowder, A.A., Rodden, R. (1984). Formation and morphology of an iron plaque on the roots of *Thypha latifolia* L. grown in solution culture. *Am. J. Bot.* 71: 666–675.
- Theil, E.C. (1987). Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem. Biophys. Acta* 1275: 161-203.
- Tornos, F. (2006). Environment of formation and styles of volcanogenic massive sulfides: The Iberian Pyrite Belt. *Ore Geol. Rev.* 28: 259-307.
- Tu, C., Ma, L.Q., Fayiga, A.O., Aillioux, E.J. (2004). Phytoremediation of arsenic-contaminated groundwater by the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. *Int. J. Phytoremed.* 6: 35-47.
- Valdés, B., Santa-Bárbara, C., Vicent, C., Muñoz, A. (2008). Catálogo florístico del Andévalo y Sierra de Huelva (plantas vasculares). *Lagascalia* 28: 117-409.
- Valdés, B., Talavera, S., Galiano, E.F. (Eds.) (1987). *Flora Vascular de Andalucía occidental*. I, II y III. Ketres Editora, S.A. Barcelona.
- Valle, F., Algarra, J.A., Arrojo, E., Asensi, A., Cabello, J., Cano, E., Cañadas, E.M., Cueto, M., Dana, E., De Simón, E., Díez, B., García, A., Jiménez, E., Gómez, F., Jiménez, M.N., Linares, J., Lorite, J., Melendo, M., Montoya, M.C., Mota, J.F., Navarro, F.B., Peñas, J., Salazar, C., Torres, J.A. (2003). Mapa de series de vegetación de Andalucía. pp: 1-131. Editorial Rueda, S.L. Madrid.
- Valle, F., Algarra, J.A., Arrojo, E., Asensi, A., Cabello, J., Cano, E., Cañadas, E.M., Cueto, M., Dana, E., De Simón, E., Díez, B., García, A., Jiménez, E., Gómez, F., Jiménez, M.N., Linares, J., Lorite, J., Melendo, M., Montoya, M.C., Mota,

- J.F., Navarro, F.B., Peñas, J., Salazar, C., Torres, J.A. (2004). Datos botánicos aplicados a la gestión del medio natural andaluz II: Series de Vegetación. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía. Sevilla.
- Vandecasteele, B., Samyn, J., Quataert, P., Muys, B., Tack, F.M.G. (2004). Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal biomagnification: A case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils. *Environ. Pollut.* 129: 363–375.
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriansen, K., Ruttens, A., Thewys, T., Vassilev, A., Meers, E., Nehnevajova, E., van der Lelie, D., Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16: 765-794.
- Vesk, P.A., Nockolds, C.E., Allaway, W.G. (1999). Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. *Plant Cell Environ.* 22: 149-158.
- Volk, G.M., Lynch-Holm, V.J., Kostman, T.A., Goss, L.J., Franceschi, V.R. (2002). The role of druse and raphide calcium oxalate crystals in tissue calcium regulation in *Pistia stratiotes* leaves. *Plant Biol.* 4: 34–45.
- Wade, W.J., Treffry, A., Laulhère, J.P. (1993). Structure and composition of ferritin cores from pea seed. *Biochim. Biophys. Acta* 1161: 91-96.
- Wang, Y.B., Liu, D.Y., Zhang, L., Li, Y., Chu, L. (2004). Patterns of vegetation succession in the process of ecological restoration on the deserted land of Shizishan copper tailings in Tongling city. *Acta Bot. Sin.* 46(7): 780-787.
- Wang, H., Ye, Z., Shu, W., Li, W., Wong, M., Lan, C. (2006). Arsenic uptake and accumulation in fern species growing at arsenic-contaminated sites of southern China: Field surveys. *Int. J. Phytoremed.* 8: 1-11.
- Wong, M.H. (2003). Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere* 50: 775-780.

- Wong, M.H., Lau, W.M. (1985). Root growth of *Cynodon dactylon* and *Eleusine indica* collected from motor ways at different concentrations of lead. *Environ. Resp.* 38: 257-267.
- Wu, F.Y., Bi, Y.L., Leung, H.M., Ye, Z.H., Lin, X.G., Wong, M.H. (2010). Accumulation of As, Pb, Zn, Cd and Cu and arbuscular mycorrhizal status in populations of *Cynodon dactylon* grown on metal-contaminated soils. *Appl. Soil Ecol.* 44: 213-218.
- Yan, W.D., Xiang, J.L., Tian, D.L. (2006). Study on characteristics of soil in mining abandoned lands in Xiangtan, Hunan Province. *Scientia Silvae Sinicae.* 42(4): 12–18 [in Chinese with English abstract].
- Yang, X., Gao, L. (2001). A study on revegetation in mining wasteland of dexing copper mine, China. *Acta Ecol. Sin.* 21(11): 1932-1940 [in Chinese with English abstract].
- Ye, Z., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J. (1998). Zinc, lead and cadmium accumulation and tolerance in *Typha latifolia* as affected by iron plaque on the root surface. *Aquat. Bot.* 61: 55-67.
- Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P. (2002). Arsenic hyperaccumulation by different fern species. *New Phytol.* 156: 27-31.
- Zhao, Y., Du, H., Wang, Z., Huang, B. (2011). Identification of proteins associated with water-deficit tolerance in C4 perennial grass species, *Cynodon dactylon* x *Cynodon transvaalensis* and *Cynodon dactylon*. *Physiol. Plantarum* 141: 40-55.
- Zuluaga, J., Rodríguez, N., Rivas-Ramirez, I., Fuente, V., Rufo, L., Amils, R. (2011). An improved semi-quantitative method for elemental analysis of plants using Inductive Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Biol. Trace Elem. Res.* 144: 1302-1317.

COPIA DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS

I. REFERENCIA COMPLETA DE LAS REVISTAS

Revista	Factor de impacto	Área temática
Ecological Engineering	3,041	Ecology Engineering, Environmental Environmental sciences
Journal of Plant Nutrition and Soil Science	1,663	Agronomy Plant science Soil science
Biological Trace Element Research	1,608	Biochemistry & molecular biology Endocrinology & metabolism
Protoplasma	3,171	Cell Biology Plant Sciences Zoology

II. OTRAS ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA TESIS

Posters y Congresos:

Poster: Rufo, L., Amils, R., Rodríguez, N., Franco, A., Asensi, A., Díez-Garretas, B., Sánchez-Mata, D., de la Fuente, V. *Examen de la capacidad de acumulación de metal en la flora del río Tinto (Helva, España)*. “XXII International Symposium of Phytosociology”. Alicante, España, 23-25 Septiembre 2009.

Comunicación Oral: Rufo, L., Rodríguez, N., Franco, A., de la Fuente, V. *Biomíneralización en las especies de *Arthrocnemum* Moq. Y *Sarcocornia* A.J. Scott. de la Península Ibérica*. “XXII International Symposium of Phytosociology”. Alicante, España, 23-25 Septiembre 2009.

Comunicación Oral: Franco, A., Rufo, L., Rodríguez, N., Amils, R., de la Fuente, V. *A study of Fe absorption of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. From the Río Tinto basin (SW Iberian Peninsula)*. “14th Iberian Symposium of Plant Mineral Nutrition”. Madrid, España, 23-26 Julio 2012.

Poster: de la Fuente, V., Rodríguez, N., Rufo, L., Teijeiro, A., Franco, A., Sánchez-Mata, D., Amils, R. *Metal Management in *Erica andevalensis* an endemic plant from the mining district of SW Iberian Peninsula*. “The International Conference: Plants, Heavy Metals, Environment”. Katowice, Polonia, 26-28 Junio, 2014. Acta Biologica Cracoviensia Vol. 56 suppl. 2 pp. 57.